

Étude comparative de la régulation transcriptionnelle des opérons *foo* et *clp*, codant respectivement pour les adhésines F165<sub>1</sub> et CS31A.

par

CÉCILE CROST

Thèse de doctorat effectuée en cotutelle

au

GREMIP, Département de Pathologie et de Microbiologie,  
Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal

ET

Laboratoire de Microbiologie de l'INRA de Theix et  
l'École Doctorale des Sciences de la vie et de la Santé, à la Faculté  
Recherche scientifique et technique, Université Blaise Pascal

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures,  
de l'Université de Montréal  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)  
en Sciences vétérinaires option Microbiologie  
et à

l'École Doctorale des Sciences de la vie et de la Santé  
Faculté Recherche scientifique et technique, Université Blaise Pascal  
en vue de l'obtention du grade de Docteur  
en Nutrition et Sciences des aliments

Octobre 2003

© Cécile Crost, 2003



SF  
607  
U54  
2004  
v.007

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

et

Université Blaise Pascal  
Faculté de Recherche scientifique et technique  
École Doctorale des Sciences de la vie et de la Santé

Cette thèse intitulée

Étude comparative de la régulation de l'a régulation transcriptionnelle  
des opérons *foo* et *c/p*, codant respectivement pour les adhésines  
F165<sub>1</sub>et CS31A.

présentée et soutenue à l'Université de Montréal par

Cécile CROST

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

- Président rapporteur : Marc DROLET, Ph.D, Département de  
Microbiologie et d'Immunologie, Université  
de Montréal
- Directrice de recherche : Josée HAREL, Ph.D, GREMIP, Université de  
Montréal
- Directrice de recherche : Christine MARTIN, Dr, HDR, Laboratoire de  
Microbiologie, INRA de Theix
- Membre du jury : Laurent CLARET, Dr, Laboratoire de  
bactériologie, Université d'Auvergne
- Examineur externe : Michel FRENETTE, Ph.D, GREB, Université  
Laval
- Représentant du doyen de la FES : Jérôme Del Castillo, Ph.D,  
Département de Biomédecine  
vétérinaire, Université de Montréal



## RÉSUMÉ

Les adhésines F165<sub>1</sub> et CS31A sont produites par des *Escherichia coli* responsables de septicémies chez le porcelet et le veau. Deux types de régulation transcriptionnelle s'exercent sur les opérons *foo* et *clp* (codant pour F165<sub>1</sub> et CS31A respectivement) : le contrôle du taux d'expression et le contrôle de la variation de phase. Les opérons *foo* et *clp* sont soumis à la régulation dépendante de la méthylation et présentent des caractéristiques communes : deux sites GATC conservés en amont de la région régulatrice, les régulateurs transcriptionnels homologues des protéines PapB et PapI. La protection par la méthylation des sites GATC est dépendante de la protéine Lrp (Leucine responsive regulatory protein). Lrp et ClpB, l'équivalent de PapB, répriment la transcription de base de *clp*. Un homologue de PapI (AfaF) est requis, avec Lrp, pour établir la variation de phase, qui déclenche la production en majorité de cellules en phase-OFF. Le mécanisme de variation de phase de *clp* a été élucidé : dans les cellules en phase-OFF, le site GATC<sub>dist</sub> est méthylé et le site GATC<sub>prox</sub> est non-méthylé, alors que dans les cellules en phase-ON, la situation inverse est établie. Conformément à cette observation, l'affinité de Lrp est plus grande pour la région GATC<sub>prox</sub> que pour la région GATC<sub>dist</sub>, aussi bien *in vitro* que *in vivo*. *In vivo*, l'apparition de cellules en phase-ON requiert la présence de AfaF qui semble augmenter l'affinité de Lrp pour le site GATC<sub>dist</sub>. Nous avons démontré que contrairement à *clp*, Lrp active la transcription de base de *foo*. Lrp et Fool (l'homologue de PapI) sont requis pour établir la variation de phase de *foo*, qui conduit à la production majoritaire de cellules en phase-ON. La corrélation du profil de méthylation avec les cellules en phase ON ou OFF est moins bien définie pour *foo* que pour *clp*, et l'affinité de Lrp est identique pour les deux régions GATC. L'influence de plusieurs conditions environnementales sur l'expression de *foo* et *clp* a été testée. Les résultats obtenus suggèrent une meilleure expression des deux opérons dans des milieux nutritionnellement pauvres, même à des pH modérément faibles et de fortes osmolarités. L'alanine, le milieu LB et les basses températures augmentent le nombre de cellules en phase-OFF, alors que le glucose et la leucine répriment la transcription de base sans modifier la variation de phase. *In vitro*, l'alanine et la leucine diminuent l'affinité de Lrp pour les deux régions GATC des régions régulatrices de *clp* et *foo*. Pour *clp*, ceci s'est traduit, *in vivo*, par l'augmentation de la méthylation du site GATC<sub>dist</sub> et de la non méthylation du site GATC<sub>prox</sub>, favorisant ainsi le profil caractéristique des cellules en phase-OFF. De plus, l'alanine empêche la protection contre la méthylation du site GATC<sub>dist</sub>.

dépendante de AfaF et ainsi l'apparition des cellules en phase-ON. Pour *foo*, en présence d'alanine, la protection contre la méthylation des deux sites GATC est augmentée, alors que la leucine favorise la méthylation des deux sites. La compréhension de ces mécanismes de régulation pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies préventives ou thérapeutiques pour lutter contre les colibacilloses.

Mots clés : adhésine, variation de phase, Lrp, *foo*, *clp*

## ABSTRACT

F165<sub>1</sub> and CS31A, belonging to the P-regulatory family, are bacterial adhesins synthesized by *E. coli* strains associated with septicemia in piglets. Two types of regulation are exerted on the *foo* and *clp* expression (encoding F165<sub>1</sub> and CS31A respectively) : the control of the expression level and the phase variation control. The *foo* and *clp* operons are under methylation-dependent transcriptional regulation. Common features of operons encoding members of this family include two conserved GATC sites in the upstream regulatory region, and transcriptional regulators homologue to the PapB and PapI proteins. Methylation protection of GATC sites was previously shown to be dependent on the leucine-responsive regulatory protein (Lrp). Lrp and ClpB, the PapB equivalent, repressed *clp* basal transcription. A PapI homologue (AfaF) was required together with Lrp to establish the phase variation control, which gave rise to a majority of phase-OFF cells. The *clp* phase variation mechanism was elucidated : in phase-OFF cells, the GATC<sub>dist</sub> site is methylated and the GATC<sub>prox</sub> site is not methylated, whereas in phase-ON cells, the inverse situation is found. Lrp affinity is higher for the GATC<sub>prox</sub> region than for GATC<sub>dist</sub> region either *in vitro* or *in vivo*. *In vivo*, appearance of phase-ON cells requires the presence of AfaF which seems to increase Lrp affinity for GATC<sub>dist</sub> site. In this study we demonstrated that in contrast to *clp*, Lrp activates the *foo* basal transcription and that Lrp and Fool (PapI homologue) are necessary for the *foo* phase variation mechanism which lead to a majority of cells phase-ON. The correlation of methylation protection patterns with cells in ON or OFF phase is less defined for *foo* than for *clp* and Lrp affinity is identical for both *foo* GATC regions. Influence of several environmental cues was tested on *foo* and *clp* expression. Results obtained suggest that best expression of both operon happens in poor nutritional medium, even at slight acidic pH or at high osmolarities. L-alanine, LB medium, and low temperature increase the number of phase OFF cells, whereas glucose and leucine repress the basal transcription without altering the phase variation. *In vitro*, alanine and leucine decrease the affinity of Lrp to both GATC regions of the *clp* and *foo* regulatory regions. For *clp*, *in vivo*, this lead to an increase of methylation of GATC<sub>dist</sub> and of non-methylation of GATC<sub>prox</sub>, which promotes the methylation pattern characteristic of OFF cells. Furthermore, alanine prevents the AfaF-dependent methylation protection of GATC<sub>dist</sub> and thus the appearance of phase-ON cells. For *foo*, in presence of alanine,

protection from methylation of both *foo* GATC sites is increased, whereas in the presence of leucine, methylation of both *foo* GATC sites is increased. Thus differences in alanine and leucine repression are observed in the two fimbrial systems. Their mechanism of action is an interesting target for a new therapeutic strategy.

Keywords : adhesin, phase variation, Lrp, *foo*, *clp*

## SOMMAIRE

<b>RESUME.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DE FIGURES .....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>XX</b>
<b>SECTION I- RECENSION DE LA LITTERATURE.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION. ....</b>	<b>1</b>
1. LES <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATHOGENES. ....	2
2. LES FACTEURS DE VIRULENCE BACTERIENS.....	4
2.1. Définition, fonctions.....	5
2.2. Les facteurs d'adhésion.....	7
2.2.1. Morphologie.....	7
2.2.2. Classification.....	10
2.2.3. Organisation génétique. ....	11
2.2.4. Modèle de biogenèse.....	13
2.2.5. Généralités sur la régulation de la synthèse des facteurs d'adhésion. ....	16
2.2.5.1. Régulation du niveau d'activité du promoteur. ....	18
2.2.5.2. Le phénomène de la variation de phase.....	19
2.2.6. Interactions hôte-pathogène.....	20
2.2.7. Conclusions. ....	21
3. GENERALITES SUR F165 <sub>1</sub> ET CS31A. ....	22
3.1. Epidémiologie et pathogénicité. ....	22
3.2. Morphologie.....	24
3.3. Déterminisme génétique.....	25

3.4. Régulation de la synthèse de CS31A et F165 <sub>1</sub> .....	27
3.4.1. La variation de phase et le taux de transcription. ....	27
3.4.2. Les données de la régulation transcriptionnelle de <i>clp</i> et <i>foo</i> . ....	28
3.4.3. La variation de phase de l'opéron <i>pap</i> . ....	33
3.4.4. Effet des conditions environnementales sur l'expression de <i>foo</i> et <i>clp</i> . ....	35
3.5. Conclusions. ....	36
4. LES REGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS DES OPERONS <i>FOO</i> ET <i>CLP</i> ET LEUR IMPLICATION DANS LA REPOSE AUX STIMULI ENVIRONNEMENTAUX. ....	37
4.1. Les protéines de régulation PapB et PapI.....	37
4.1.1. PapB et ses homologues. ....	37
4.1.2. PapI et ses homologues. ....	38
4.2. Les régulateurs globaux. ....	40
4.2.1. LRP, Leucine responsive regulatory protein.....	40
4.2.1.1. Généralités sur Lrp. ....	40
4.2.1.2. Structure. ....	42
4.2.1.3. Interaction Lrp-ADN. ....	46
4.2.1.4. Le régulon Lrp. ....	47
4.2.1.5. Classement du régulon de Lrp selon l'effet de Lrp et de la leucine. ....	50
4.2.1.6. Mécanisme d'action de la leucine et de l'alanine. ....	51
4.2.1.7. En conclusion. ....	51
4.2.2. Déoxyadénosine méthylase. ....	52
4.2.3. CRP, « cAMP receptor protein ».....	54
4.2.3.1. Structure. ....	54
4.2.3.2. Fonction et classes (répression catabolique). ....	55
4.2.3.3. Effet de CRP sur les opérons <i>pap</i> et <i>foo</i> . ....	57
4.2.4. H-NS. ....	58
4.2.4.1. Structure. ....	58

4.2.4.2. Fonction. ....	59
4.2.4.3. Effet de H-NS sur l'opéron <i>pap</i> . ....	60
4.2.5. RimJ. ....	61
PROBLEMATIQUE. ....	62
<b>SECTION II-METHODOLOGIE ET RESULTATS.....</b>	<b>64</b>
1. ARTICLE I : INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL CUES ON THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF <i>FOO</i> AND <i>CLP</i> CODING FOR F165 <sub>1</sub> AND CS31A ADHESINS IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> . ....	66
1.1. Abstract. ....	66
1.2. Introduction. ....	67
1.3. Materials and Methods. ....	68
1.3.1. Bacterial strains and media. ....	68
1.3.2. Construction of single copy <i>foo-lacZ</i> fusion lysogens. ...	69
1.3.4. $\beta$ -galactosidase activity assay. ....	70
1.3.5. Calculation of the phase transition frequency. ....	71
1.3.6. Statistical analysis. ....	71
1.4. Results. ....	71
1.4.1. Regulation of <i>fooB</i> and <i>fooI</i> transcription. ....	71
1.4.2. Environmental regulation of <i>clp</i> and <i>foo</i> expression. ....	72
1.4.2.1. Effect of environmental factors on the <i>clp</i> and <i>foo</i> steady-state expression. ....	73
1.4.2.2. Effect of environmental factors on <i>clp</i> and <i>foo</i> phase variation. ....	74
1.5. Discussion. ....	75
1.6. Acknowledgements. ....	78
1.7. References. ....	85
2. ARTICLE II : LEUCINE-RESPONSIVE REGULATORY PROTEIN- MEDIATED REPRESSION OF <i>CLP</i> (ENCODING CS31A) EXPRESSION BY L-LEUCINE AND L-ALANINE IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> . ....	90
2.1. Abstract. ....	90

2.2. Introduction. ....	91
2.3. Materials and methods. ....	93
2.3.1. Bacterial strains and media. ....	93
2.3.2. Assay of $\beta$ -galactosidase activity. ....	94
2.3.3. Calculation of the switch frequency. ....	94
2.3.4. DNA sequencing. ....	95
2.3.5. DNA hybridizations. ....	95
2.4. Results. ....	96
2.4.1. CS31A phase variation. ....	96
2.4.2. Influence of leucine and alanine on <i>clp</i> expression. ....	98
2.4.3. DNA methylation pattern analysis. ....	98
2.5. Discussion. ....	100
2.6. References. ....	110
3. ARTICLE III: INFLUENCE OF L-ALANINE AND L-LEUCINE ON METHYLATION OF GATC SITES AND LRP BINDING TO REGULATORY REGIONS OF THE <i>FOO</i> AND <i>CLP</i> OPERONS. ....	116
3.1. Abstract. ....	116
3.2. Introduction. ....	117
3.3. Materials and Methods. ....	119
3.3.1. Bacterial strains and media. ....	119
3.3.2. Observation of phase variation. ....	119
3.3.3. Statistical analysis. ....	120
3.3.4. DNA hybridizations. ....	120
3.3.5. Production and purification of Lrp. ....	121
3.3.6. Gel retardation. ....	121
3.4. Results. ....	122
3.4.1. Gel retardation. ....	122
3.4.2. Methylation pattern of <i>foo</i> DNA. ....	124
3.5. Discussion. ....	125
3.5.1. Effect of alanine and leucine on the Lrp affinity for <i>clp</i> DNA. ....	126



3.5.2. Effect of alanine and leucine on the Lrp-DNA binding and on methylation of GATC sites of <i>foo</i> DNA.....	127
3.6. Acknowledgements. ....	129
3.7. References.....	137
<b>SECTION III : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>140</b>
DISCUSSION.....	141
1.1. Effet des conditions environnementales sur la régulation transcriptionnelle des opérons <i>clp</i> et <i>foo</i> .....	142
1.1.1. Effet du pH et de l'osmolarité.....	142
1.1.2. Effet du glucose.....	143
1.1.3. Effet de la température.....	143
1.1.4. Effet de l'alanine et de la leucine.....	144
1.2. Régulation transcriptionnelle de l'opéron <i>clp</i> .....	146
1.3. Régulation transcriptionnelle de l'opéron <i>foo</i> .....	152
CONCLUSIONS.....	158
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>159</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>182</b>
ANNEXE 1 : EFFET DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR L'ACTIVITE DU PROMOTEUR DE <i>FOOI</i> .....	XXI
ANNEXE 2 : CONSTRUCTION ET PURIFICATION DES PROTEINES DE FUSION CBP-FOOI, CBP-FOOB, CBP-CLPB. ....	XXII
ANNEXE 3 : PRODUCTION ET PURIFICATION DES ANTICORPS IGY ANTI-FOOI ET ANTI-LRP. ....	XXV
ANNEXE 4 : ABSORPTION ET METABOLISME DE LA LEUCINE ET DE L'ALANINE CHEZ <i>E. COLI</i> . ....	XXVI

## LISTE DES TABLEAUX

### SECTION I

<b>Tableau 1</b> : Pathovars d' <i>E.coli</i> pathogènes chez l'homme et l'animal. ....	4
<b>Tableau 2</b> : Liste et caractéristiques de facteurs d'adhésion produits par <i>E. coli</i> . ....	9
<b>Tableau 3</b> : Comparaison de la régulation transcriptionnelle des opérons <i>pap</i> , <i>fae</i> , <i>fan</i> , <i>foo</i> et <i>clp</i> . ....	36
<b>Tableau 4</b> : Classement des nucléotides et résidus aminés selon le domaine de fonction de Lrp, d'après l'étude de mutagenèse dirigée de Platko et Calvo (1993). ....	45
<b>Tableau 5</b> : Le régulon Lrp. ....	49

### SECTION II

#### Article I

<b>Table 1</b> : Strain, plasmids and bacteriophages description. ....	79
<b>Table 2</b> : Phase variation phenotype, switch frequencies and $\beta$ -galactosidase activity of <i>fooB</i> and <i>fooI</i> promoters. ....	81
<b>Table 3</b> : Effect of different environmental cues on the <i>clp</i> and <i>foo</i> promoters activity. ....	84

#### Article II

<b>Table 1</b> : Transcription levels of <i>clp-lacZYA</i> in different media and different genetic backgrounds. ....	106
<b>Table 2</b> : Methylation patterns of the <i>clp</i> regulatory region. ....	108

#### Article III

<b>Table 1</b> : Strain, plasmids and bacteriophages description. ....	130
<b>Table 2</b> : Primers and their combination used for synthesis of digoxigenin labeled DNA fragments. ....	131
<b>Table 3</b> : Methylation pattern of the <i>foo</i> regulatory region. ....	135

### SECTION III

<b>Tableau 1</b> : Taux de transition de phase des opérons <i>clp</i> , <i>pap17</i> , <i>pap21</i> et <i>foo</i> , ainsi que le pourcentage de bactéries en phase ON. ....	147
---	-----

<b>Tableau. 2</b> : Comparaison des six sites de liaison de Lrp à la région régulatrice de <i>pap-17</i> et des sites potentiels de fixation de Lrp à la région régulatrice de <i>foo</i> .....	153
---	-----

## ANNEXES

<b>Tableau A1</b> : Phénotype de la variation de phase, fréquences de transition et activité $\beta$ -galactosidase du promoteur de <i>fooI</i> .....	xxi
---	-----

<b>Tableau A2</b> : Niveau de croissance bactérienne et temps d'incubation requis pour la surproduction des protéines de fusion CBP-FooI, CBP-FooB et CBP-ClpB.....	xxiii
---	-------

## LISTE DE FIGURES

### SECTION I

<b>Fig. 1:</b> Représentation schématique d'une cellule d' <i>E.coli</i> interagissant avec les tissus de l'hôte, soulignant les facteurs de virulence bactériens.....	6
<b>Fig. 2:</b> Cartes des gènes codant pour la biogenèse des fimbriae K88, K99, 987P, P, type I, S et F17a. ....	13
<b>Fig. 3 :</b> Mode d'assemblage des facteurs d'adhésion Curli et Pap de <i>E. coli</i> .....	14
<b>Fig. 4:</b> Images obtenues à la suite de la digitalisation des images en microscopie électronique du système d'assemblage du pili type I à partir de la protéine d'ancrage. ....	16
<b>Fig. 5 :</b> Schéma de deux types de régulation transcriptionnelle : La variation de phase et le taux d'expression. ....	17
<b>Fig. 6 :</b> Visualisation microscopique de F165 et CS31A à la surface de <i>E. coli</i> par immunomarquage à l'or et à la ferritine respectivement. ....	25
<b>Fig. 7 :</b> Organisation génétique des opérons <i>foo</i> et <i>clp</i> . ....	26
<b>Fig. 8 :</b> Schéma de la variation de phase de l'opéron <i>pap</i> , sous le contrôle par la méthylation des sites GATC tel que proposé par Herdnay <i>et al.</i> , 2002.....	27
<b>Fig. 9:</b> Comparaison par alignement des séquences peptidiques des protéines régulatrices et des séquences nucléotidiques des régions régulatrices des opérons <i>pap</i> , <i>foo</i> et <i>clp</i> .....	30
<b>Fig. 10 :</b> Schéma de la variation de phase de l'opéron <i>pap</i> , sous le contrôle par la méthylation des sites GATC tel que proposé par Herdnay <i>et al.</i> , 2002.....	34
<b>Fig. 11:</b> Comparaison des protéines régulatrices B des opérons <i>pap</i> , <i>foo</i> et <i>clp</i> . ....	38
<b>Fig. 12:</b> Comparaison des protéines régulatrices I des opérons <i>pap</i> et <i>foo</i> . ....	39

<b>Fig. 13:</b> Alignement des séquences peptidiques de LrpA de <i>P. furiosus</i> , Lrp de <i>E.coli</i> et AsnC de <i>E.coli</i> .	41
<b>Fig. 14:</b> Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de LrpA de <i>P. furiosus</i> .	43
<b>Fig. 15:</b> Représentation schématique (A) d'un dimère de LrpA et (B) d'un octamère de LrpA.	44
<b>Fig. 16 :</b> Schéma de l'interaction entre un dimère de CRP-AMPC et sa cible ADN.	55

## SECTION II

### ArticleI

<b>Fig. 1 :</b> Physical maps of single-copy <i>fooB-lacZYA</i> , <i>fooI-lacZYA</i> and <i>clpB-lacZYA</i> fusions.	80
<b>Fig. 2 :</b> Effect of environmental factors on the <i>foo</i> and <i>clp</i> promoters activity in MC4100.λ02 and MC4100.λ6.	82
<b>Fig. 3 :</b> Effect of individual amino acids on <i>fooB-lacZYA</i> and <i>clpB-lacZYA</i> activity in strains MC4100.λ02 (Lrp+, FooI-), MC4100.λ6 (Lrp+, AfaF-) and DL844.λ6 (Lrp-, AfaF-).	83

### ArticleII

<b>Fig. 1 :</b> The <i>clp</i> regulatory region, sequences surrounding the <i>clp</i> operon, and operon fusion constructs.	105
<b>Fig. 2 :</b> Analysis of the in vivo GATC methylation states of the <i>clp</i> regulatory region.	107
<b>Fig. 3 :</b> Model for control of <i>clp</i> expression by Lrp, AfaF, ClpB, and alanine.	109

### ArticleIII

<b>Fig. 1 :</b> Physical maps of single-copy <i>fooB-lacZYA</i> and <i>clpB-lacZYA</i> fusions.	130
<b>Fig. 2 :</b> Schematic representation of DNA fragments used in gel shift.	131
<b>Fig. 3:</b> Gel shift experiments with F <sub>dist-prox</sub> fragment.	132
<b>Fig. 4 :</b> Lrp affinity for <i>foo</i> or <i>clp</i> DNAs.	133

<b>Fig. 5</b> : Lrp affinity for <i>foo</i> or <i>clp</i> DNAs, in presence of alanine or leucine. ....	134
---	-----

<b>Fig. 6</b> : Analysis of the <i>in vivo</i> GATC methylation states of the <i>foo</i> regulatory region.....	136
---	-----

### SECTION III

<b>Fig. 1</b> : Modèle de la régulation transcriptionnelle de l'opéron <i>clp</i> et de l'effet de l'alanine et de la leucine.....	148
--	-----

### ANNEXES

<b>Fig. A1</b> : Schéma de la purification par chromatographie d'affinité des protéines de fusions CBP-FooI et CBP-FooB. ....	xxiv
---	------

<b>Fig. A2</b> : Schéma des voies de biosynthèse de L-alanine chez <i>E. coli</i> . ....	xxvii
--	-------

<b>Fig. A3</b> : Schéma des voies de biosynthèse de l'isoleucine, de la valine et de la leucine.....	xxix
--	------

Les gènes codant pour les enzymes ainsi que les enzymes sont indiqués en rouge. ....	xxix
--	------

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine (pour l'ADN) ou L-alanine (pour une protéine)
A ou Ala	L-alanine
ADN ( <i>DNA</i> )	Acide désoxyribonucléotidique ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
Afa	<i>Afimbrial adhesin</i> ou adhésine afimbriaire
Amp	Ampicilline
AMPC (cAMP)	AMP cyclique ou adénosine monophosphate cyclique ( <i>cyclic adenosin monophosphate</i> )
Amp <sup>R</sup>	Résistance à l'ampicilline
Antigène F	Antigène flagellaire
Antigène K	Antigène capsulaire
Antigène O	Antigène oligosaccharidique
AR1	<i>Activation region 1</i> : région d'activation de CRP ou CAP
ARN ( <i>RNA</i> )	Acide ribonucléique ( <i>ribonucleic acid</i> )
ARNase ( <i>RNase</i> )	Acide ribonucléase
ARNm ( <i>mRNA</i> )	ARN messenger
Asp	Acide aspartatique
ATP	Adenosine triphosphate
B ou Asx	Acide aspartique ou L-asparagine
C ou Cys	L-cystéine
C	Cytosine
CAP ou CRP	<i>Catabolite Activator Protein</i> ou <i>cAMP Receptor Protein</i> ou protéine activateur catabolique ou protéine récepteur de l'AMPC
<i>clp</i>	capsule like
Cm	Chloramphénicol
Cm <sup>R</sup>	Résistance au chloramphénicol
D ou Asp	acide aspartique
Dam	<i>Deoxyadenosine methylase</i> , <i>DNA Adenine Methylase</i> ou <i>Deoxyadenosine methyltransferase</i> ou Déoxyadénosine méthyltransférase
DO ( <i>OD</i> )	Densité optique ( <i>Optical Density</i> )
E ou Glu	Acide glutamique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F ou Phe	L-phénylalanine
<i>fim</i>	
<i>foo</i>	<u>f</u> one hundred sixty-five <u>one</u>
<i>fot</i>	<u>f</u> one hundred sixty-five <u>two</u>
G ou Gly	L-glycine
G	Guanosine
g	Nombre de génération bactérienne qui ont donné lieu à la colonie
GATC-I ou GATC 1 ou GATC distal	GATC 1028 ou GATCdist
GATC-II ou GATC 2 ou GATC proximal	GATC 1130 ou GATCprox

Glu	Glucose
Glu	Glycérol
H ou His	L-histidine
H	Atome d'hydrogène
His <sub>6</sub> ou 6His	<i>His-tag</i> ou queue poly histidine
H-NS	<i>Histone-like nucleoid structuring protein</i> ou protéine similaire à une histone structurant le nucléoïde
HTH	Hélice-tour-hélice
I ou Ile	L-isoleucine
K ou Lys	L-lysine
Km	Kanamycine
KmR	Résistance à la kanamycine
L ou Leu	L-leucine
Lac	Phénotype lactose
LB	Luria-Bertani
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
Lrp	<i>Leucine responsive regulatory protein</i> ou protéine de réponse à la leucine
M ou Met	L-méthionine
<i>M</i>	Nombre de cellule ayant effectuées une variation de phase
MRHA	<i>Mannose Resistant Haemagglutination</i> ou hémagglutination résistante au mannose
MS	<i>Mannose sensitive</i> ou sensible au mannose
N ou Asn	L-asparagine
N	Atome d'azote
<i>N</i>	Nombre total de cellules évaluées
N	Nucléotides
O	Atome d'oxygène
OFF	Phase OFF ou phase de non expression de l'opéron
OMP	<i>Outer membrane protein</i> ou protéine de la membrane externe
ON	Phase ON ou phase d'expression de l'opéron
P ou Pro	L-proline
<i>pap</i>	<i>Pyelonephritis associated pili</i> ou fimbriae associé à la pyélonéphrite
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction ou réaction en chaîne de polymérisation
PhoA	Alkaline Phosphatase ou phosphatase alcaline
PMLs	<i>Porcine polymorphonuclear leukocytes</i> ou leucocytes polymorphonucléaires porcins
<i>prs</i>	<i>pap</i> -related sequence ou séquence apparentée à <i>pap</i>
Q ou Gln	L-glutamine
R ou Arg	L-arginine



RNase E	Ribonucléase E
RNase H	Ribonucléase H
Rpm	Révolution par minute
S ou Ser	L-sérine
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
T ou Thr	L-thréonine
T	Thymidine
TBE	Tris Borate EDTA
Tet	Tétracycline
Tet <sup>R</sup>	Résistance à la tétracycline
Tn	Transposon
Tn10	Transposon codant pour la résistance à la tétracycline
Tn <i>phoA</i>	Transposon codant pour la phosphatase alcaline
V ou Val	L-valine
W ou Trp	L-tryptophane
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
Y ou tyr	L-tyrosine
Z ou Glx	acide glutamique ou L-glutamine
$\alpha$ CTD	Domaine carboxy terminal de la sous-unité alpha de la ARN polymérase
$\beta$ -gal	$\beta$ -galactosidase

Unités de mesure			
g	gramme	mM	millimolaire ( $10^{-3}$ M)
h	heure	mosM	milliosmolaire ( $10^{-3}$ osM)
kb	kilobase ( $10^3$ base)	ng	nanogramme ( $10^{-9}$ g)
kDa	kiloDaltons	nm	nanomètre ( $10^{-9}$ m)
kV	kiloVolts	nM	nanomolaire ( $10^{-9}$ M)
L	litre	pb ( <i>bp</i> )	paire de base ( <i>base pair</i> )
m	mètre	UM ( <i>MU</i> )	unité Miller ( <i>Miller's unit</i> )
M	molaire	V	Volts
osM	osmolaire	$\mu$ g	microgramme ( $10^{-6}$ g)
mg	milligramme ( $10^{-3}$ g)	$\mu$ l	microlitre ( $10^{-6}$ L)
min	minute	$\mu$ M	micromolaire ( $10^{-6}$ M)
ml	millilitre ( $10^{-3}$ L)		
Symboles			
$\alpha$	Alpha	$\pm$ ou $\pm/-$	Plus ou moins
$\beta$	Bêta	$<$	Plus petit que
$\Delta$	Delta	$>$	Plus grand que
$\lambda$	Lambda	$^{\circ}$	Degré
		$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui ont rendu ce projet de doctorat réalisable, et plus particulièrement :

à Josée Harel, directrice de recherche, pour votre soutien, votre patience, vos idées, votre rigueur et surtout pour avoir cru en moi...

à Christine Martin, codirectrice de recherche, pour votre analyse critique, vos suggestions pertinentes, vos connaissances, pour m'avoir enseigné les techniques de bases en biologie moléculaire et de m'avoir permis de continuer mon projet de D.E.A...

à Elaine Newman, Georges Szatmari et Daneil Dubreuil pour vos conseils techniques et vos connaissances...

à Marie Catherine Tessier, Annie Garrivier et Alix pour m'avoir initié au phage  $\lambda$ RS45, aux techniques de base en biologie moléculaire, au « plaisir » des commandes sur consolab et à la PCR en temps réel...

aux membres du GREMIP et du laboratoire de microbiologie de l'INRA de Theix pour le partage de vos idées, de vos connaissances, pour avoir « subit » les premiers jets de mes séminaires et pour tous les bons moments passés ensemble,

à tous les membres du SRV microbiologie (INRA), du métabolisme azoté (INRA), du laboratoire de bactériologie de la Faculté de Pharmacie (Université d'Auvergne), chercheurs, collègues et amis ainsi qu'à Carl Uhland pour votre soutien technique, le partage des connaissances...

à Harivony Rakotoarivonina, Frédéric Berthiaume, Aurélie Caille et Marie Claude Champagne, stagiaires d'été ou de maîtrise pour l'avancement de ce projet,

à Micheline Saint-Germain (Université de Montréal) et Elaine Passemard (Université Blaise Pascal) pour leur disponibilité et pour avoir rendu possible la cotutelle au niveau administratif

à ma famille, ma belle-famille et mes amis pour vos encouragements, votre support, et pour votre coup de main lors des six déménagements,

à Philippe Berthiaume, mon époux, pour ta compréhension de conjoint et d'étudiant au doctorat, ton soutien, tes encouragements et ton regard critique sur mes problèmes d'analyse statistique, pour ton aide en informatique.

au GREMIP et au département de santé animale de l'INRA pour le soutien financier,

au FCAR (fond 0214) et au CRSNG (fond OGP0025120) et à l'INRA, Département de santé animale, pour le financement de ce projet de doctorat.

## SECTION I- Recension de la littérature

## INTRODUCTION.

Ce projet de doctorat est réalisé en cotutorat Québec-France entre le GREMIP et l'INRA, sous la direction du Dre Josée HAREL et du Dre Christine MARTIN. Il consiste en l'étude comparative de la régulation de l'expression des opérons *foo* et *clp* codant pour les adhésines F165<sub>1</sub> et CS31A, produites par des *Escherichia coli* responsables de septicémies et de diarrhées chez le porcelet et le veau.

*Escherichia coli* est une bactérie commensale du tube digestif de l'Homme et de l'animal. Cependant, certaines souches sont pathogènes et responsables d'infections intestinales ou extra-intestinales, telles que des cystites, pyélonéphrites, septicémies, méningites. Les bactéries pathogènes synthétisent des facteurs de virulence qui leur permettent de coloniser les muqueuses de l'hôte, de résister à l'activité bactéricide du sérum, à la phagocytose... Parmi ces facteurs de virulence, les adhésines permettent aux bactéries d'adhérer aux cellules épithéliales de l'hôte, leur évitant ainsi d'être éliminées par les flux biologiques et leur permettant de coloniser efficacement les muqueuses. Ces adhésines sont requises lors de l'étape primordiale du processus infectieux, mais leur synthèse n'est pas nécessaire en permanence. En effet, l'interaction hôte-pathogène est un processus dynamique dans lequel le pathogène rencontre diverses conditions environnementales. Sa survie en différents endroits de l'hôte nécessite de sa part des réponses adaptatives. Pour cela, il doit répondre en permanence aux stimuli qu'il reçoit de son environnement immédiat. Ainsi, les systèmes de régulation spécialisés contrôlant l'expression des facteurs de virulence sont complexes et indispensables à sa survie. Comprendre comment des facteurs présents dans l'environnement immédiat du pathogène peuvent réguler la synthèse de facteurs de virulence est important dans l'optique du développement de nouvelles drogues anti-infectieuses en alternative à l'utilisation d'antibiotiques.

## 1. LES *ESCHERICHIA COLI* PATHOGENES.

*Escherichia coli* est une bactérie à Gram-négatif capable d'occuper des niches écologiques variées. C'est une bactérie commensale du tube digestif des mammifères, mais aussi un microorganisme pathogène lorsqu'il possède des facteurs de virulence. C'est donc un pathogène susceptible d'occasionner une grande diversité de pathologies, qu'elles soient intestinales (entérites, diarrhées) ou extra-intestinales (infections urinaires, septicémies, méningites, mammites).

Dans le cas des infections entériques, *E.coli* est à l'origine de différents symptômes dont des diarrhées pouvant prendre des formes diverses selon l'expression des facteurs de virulence caractérisant le pathovar qui prolifère massivement au contact de l'épithélium intestinal, (production d'entérotoxines cytotoniques ou cytotoxiques, entéroinvasion, entéroadhésion,...). Il existe au moins six classes d'*E. coli* pathogènes : EPEC (*E.coli* entéropathogènes), DAEC (*E.coli* à adhésion diffuse), EAEC (*E.coli* EntéroAggrégatives), STEC (*E.coli* produisant la Toxine de type Shiga) dont les souches humaines appelées EHEC (*E.coli* entérohémorragiques), EIEC (*E.coli* entéroinvasives) et les ETEC (*E.coli* entérotoxinogènes) (Donnenberg et Whittam, 2001; Levine, 1987). Dans le cas des infections extra-intestinales, il peut s'agir de colibacilles qui franchissent la paroi épithéliale par translocation comme les SEPEC (*E.coli* septicémiques) et MENEK (*E.coli* responsables de méningites) ou d'une contamination d'autres organes par les matières fécales comme pour les UPEC (*E.coli* responsables d'infections urinaires), ainsi que les *E.coli* responsables de mammites bovines et porcines (Fairbrother et Ngeleka, 1994). Des critères étiopathogéniques sont actuellement à l'origine d'une classification des *E.coli* pathogènes en plusieurs familles qui se distinguent par les facteurs de virulence, les symptômes cliniques, les caractéristiques épidémiologiques et l'appartenance à divers sérotypes O, K et H (Tableau 1).

Quelle que soit l'infection considérée, l'adhésion des bactéries à la surface des muqueuses de l'hôte est une étape primordiale puisqu'elle permet la colonisation des tissus par les pathogènes qui, dès lors, ne sont plus éliminés par les processus naturels (péristaltisme intestinal, flux biologiques) et peuvent ainsi exprimer leur pathogénicité avec un maximum d'efficacité. Cette adhésion peut être réalisée, soit de façon non spécifique par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes et/ou électrostatiques entre les bactéries et les

cellules épithéliales, soit de façon spécifique. Dans ce cas, des structures particulières présentes à la surface bactérienne, nommées facteurs d'adhésion ou adhésines, reconnaissent certains récepteurs sur les cellules cibles eucaryotes.

PATHOVARS		PROPRIÉTÉS	Références
EPEC ( <i>E.coli</i> entéropathogène) <u>Facteurs de virulence</u>		<b>Colonisation de l'intestin grêle avec lésions de la muqueuse</b> Adhésion aux entérocytes / adhésion localisée aux cellules HEp2 et HeLa en culture Présence d'EAF (EPEC Adherence Factor) à déterminisme plasmidique (50-70 Mda) système de sécrétion de type III, l'intimine de 94 kDa EAE ( <i>E.coli</i> Attachement-Effacement) et son récepteur Tir, impliqués dans les lésions histologiques d'attachement-effacement des mi Selon les souches, production de la toxine lymphostatine.	Donnenberg et Whittam, 2001  Levine, 1987
	<u>Sérogroupe principaux</u>	O111:H2, O114:H2, O126:H2, O128:H2, O55:H6, O119:H6, O125:H6, O127:H6, O142:H6	
DAEC (Diffuse Adhering <i>E.co</i> )		<b>Colonisation du caecum et du colon</b> Adhésion aux entérocytes/ adhésion diffuse aux cellules HEp2 et HeLa en culture Protéine de 100 kDa impliquée dans l'adhésion diffuse isolée de souche O126:H7	Okeke et Nataro, 2001
	<u>Facteurs de virulence</u>		
	<u>Sérogroupe principaux</u>	O4, O15, O28, O44, O50, O55, O69, O75, O86, O125, O126, O127, O128	
EAEC ( <i>E.coli</i> EnteroAggrégatif)		Adhésion ni diffuse ni localisée "biofilm like" Production d'entérotoxine cytotonique thermostable (ST)	
STEC/VTEC dont EHEC ( <i>E.coli</i> produisant la toxine Shiga-like ou Vero-toxine, <i>E.coli</i> entérohémorragiques)		<b>Colonisation de l'intestin grêle et lésions de la muqueuse</b>	Nataro et Kaper, 1998  Wasteson, 2001 Donnenberg et Whittam, 2001 Levine, 1987
	<u>Facteurs de virulence</u>	Plasmide de virulence de 60 MDa sécrétion de type III, l'intimine de 94kDa EAE ( <i>E.coli</i> Attachement-Effacement) et son récepteur Tir, impliqués dans les lésions histologiques d'attachement-effacement des microvillosités intestin Production hémolysine (plasmide) Forte production de toxines shiga-like (SLT) (stx1, stx2). Selon souche, production de lymphostatine.	
	<u>Sérogroupe principaux</u>	O157:H7, O26:H11, O111:H8, O103:H2, O145, O138:K81:H-, O139:K82:H1, O141:K85:H4, O157:H7, O26:H11, O111:NM, O4:NM, O8:H9, O149:H8, O7:H40	
EIEC ( <i>E.coli</i> entéroinvasifs)		<b>Invasion et prolifération dans les cellules épithéliales in vivo et en culture</b>	Levine, 1987
	<u>Facteurs de virulence</u>	Plasmide de virulence de 140 MDa (-shigelles) codant pour des protéines de la membrane externe, d'adhésion et d'expression du pouvoir invasif. Production de cytotoxines de type Shiga (SLT) mais immunologiquement différentes de celle des EHEC	
	<u>Sérogroupe principaux</u>	O28ac, O112, O124, O136, O143, O144, O173	

PATHOVARS		PROPRIÉTÉS	Références
ETEC ( <i>E.coli</i> entérotoxigène)	Facteurs de virulence	Colonisation de l'intestin grêle sans lésions de la muqueuse Plasmide de virulence de 27 MDa codant pour des protéines de la membrane externe, des protéines d'adhésion et des toxines chez O159:H4 Adhésion aux entérocytes par divers fimbriae expliquant la spécificité d'hôte (CFA/I-II, CS1-6....). Production d'entérotoxines cytotoniques thermostables (ST) et / ou thermolabiles (LT).	Levine, 1987 Nagy et Fekete, 1999
	Sérogroupe principaux	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63' O78, O80, O85, O115, O128ac, O139, O148, O153, O159, O167, O6:H16, O8:H9, O15:H11, O25:H42, O78:H12, O120:H7, O20:H-, O8, O9, O20, O101, O141, O147, O157	
SEPEC ( <i>E.coli</i> septicémiques)	Facteurs de virulence	Colonisation puis translocation et dissémination par la circulation sanguine Adhésion aux cellules épithéliales (digestives ou uro-génitales) par diverses adhésines fimbriales ou non. Résistance à l'effet bactéricide du sérum: nature du LPS / capsule K / protéines membranaires (Tra T) Résistance à la phagocytose: capsule K Production d'aérobactine Production d'hémolysine	Cherifi <i>et al.</i> , 1990 Fairbrother et Ngeleka, 1994
	Sérogroupe principaux	O15, O55, O78, O86, O115, O137, O6, O8, O9, O11, O15, O17, O18, O20, O45, O60, O78, O83, O93, O101, O112, O115, O116	
MENEC ( <i>E.coli</i> responsables de méningites)		Colonisation liquide Adhésines fimbriaire (S, type I) R:K1 ( LPS rugueux )	Korhonen <i>et al.</i> , 1985
UPEC ( <i>E.coli</i> uropathogènes)	Facteurs de virulence	Colonisation des vois urogénitales pouvant causer des atteintes du parenchyme rénal Adhésion aux cellules uroépithéliales par diverses adhésines fimbriales ou non. Résistance à l'effet bactéricide du sérum: nature du LPS / capsule K / protéines membranaires (Tra T, Iss) Résistance à la phagocytose: capsule K Production d'aérobactine Production d'hémolysine	Johnson, 1991
	Sérogroupe principaux	O1:K1:H7, O4:K12:H1, O6:K2:H1, O16:K1:H6, O6:K13:H1, O6:K1:H6	
<i>E.coli</i> responsables de mammite		peu d'études	Fairbrother et Ngeleka, 1994
Facteurs de virulence		hypothèse: endotoxine Fimbriae non corrélés avec signes cliniques	

**Tableau 1** : Pathovars d'*E.coli* pathogènes chez l'homme et l'animal.

## 2. LES FACTEURS DE VIRULENCE BACTERIENS.

Dans ce chapitre une classification des facteurs de virulence est donnée, mais seuls les facteurs d'adhésion et leur production seront décrits.

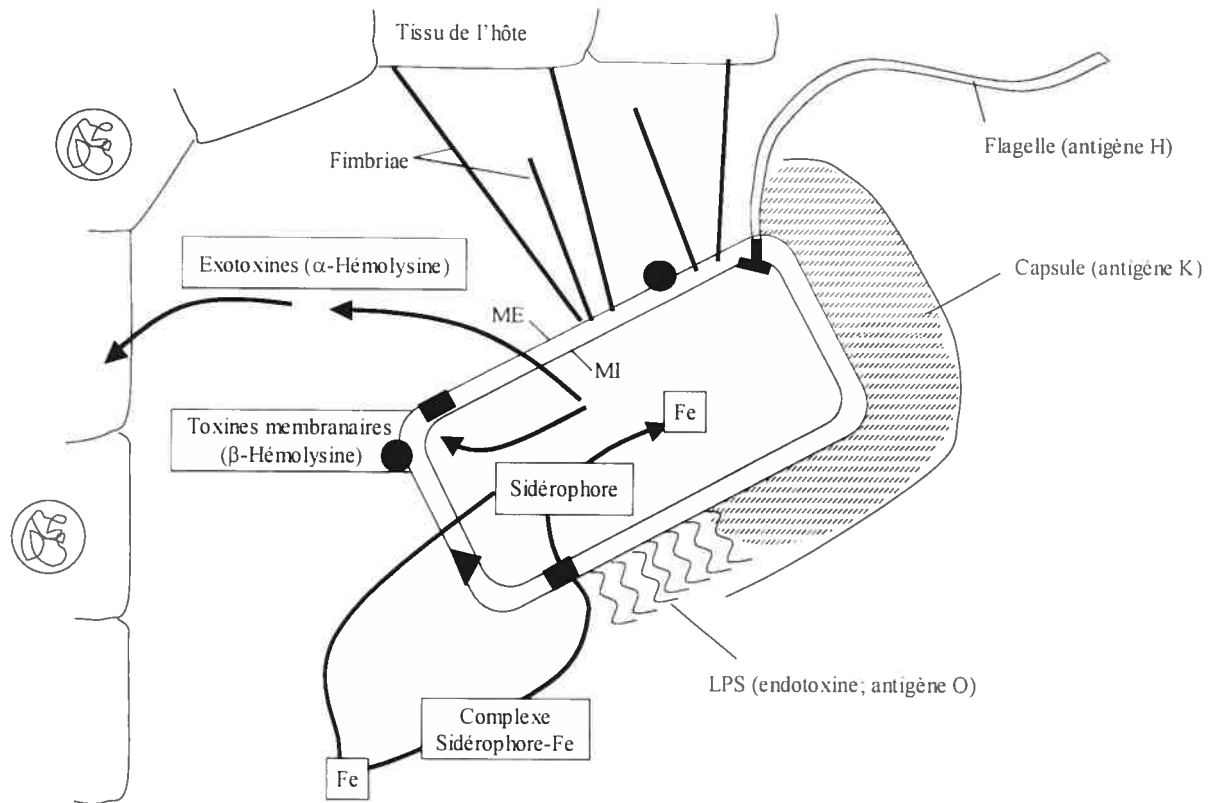
## 2.1. Définition, fonctions.

Les micro-organismes pathogènes, au cours de l'établissement d'une infection, synthétisent des facteurs de virulence leur permettant de survivre et de se multiplier dans l'hôte (Fig. 1). On les classe selon leur fonction en 4 grandes catégories :

- Les facteurs de virulence permettant la colonisation du rumen, de l'intestin, de la cavité buccale, des voies urinaires.
- Les facteurs de virulence capables d'induire la mort d'un organisme ou des désordres pathologiques et qui sont appelés toxines.
- Les facteurs de virulence permettant l'invasion des cellules eucaryotes.
- Les facteurs de virulence permettant la dissémination du micro-organisme.

Ces facteurs de virulence confèrent un avantage à la bactérie dans un environnement spécifique auquel elle peut ainsi s'adapter. Ils ne sont donc pas synthétisés de façon constitutive. Par exemple, un facteur synthétisé au niveau intestinal, et donnant un avantage compétitif envers les micro-organismes de la flore commensale, n'a plus lieu d'être synthétisé au niveau sanguin. L'environnement direct de la bactérie est donc capable de contrôler l'expression de ses facteurs de virulence. Le micro-organisme capte des signaux environnementaux comme la température, le pH, l'osmolarité, la nature de la source de carbone, la concentration en acides aminés, en fer, en ammonium, etc. ... Il y répond de façon appropriée en synthétisant les facteurs de virulence adéquats et en réprimant la synthèse de ceux qui sont inutiles dans l'environnement présent (Harel et Martin, 1999).





**Fig. 1:** Représentation schématique d'une cellule d'*E.coli* interagissant avec les tissus de l'hôte, soulignant les facteurs de virulence bactériens. Les protéines membranaires impliquées dans le transport et la résistance au sérum sont indiquées par des carrés, triangles et ronds noirs. ME, membrane externe; MI, membrane interne; LPS, lipopolysaccharide. Tiré de Johnson, 1991.

En général, les gènes codant pour la synthèse de ces facteurs de virulence sont regroupés dans des zones appelées îlot de pathogénicité sur le chromosome ou sur un plasmide. Les îlots de pathogénicité (PAIs pour « pathogenicity island ») sont de larges fragments d'ADN situés sur le chromosome des bactéries pathogènes, et codant pour des gènes de virulence (Hacker, 1996). Voici les critères les caractérisant :

- portent des gènes de virulence, souvent plusieurs.
- présents chez les souches pathogènes, et absents (ou distribution sporadique) chez les souches non pathogènes dans une même espèce (ou espèce apparentée).

- contenu en G+C différent de celui de l'ADN bactérien de l'hôte.
- occupation de grandes régions chromosomiques (souvent supérieures à 30kb).
- contiennent des unités génétiques compactes et distinctes, souvent flanquées d'unités répétitives aux extrémités.

associés avec des gènes ARNt et/ou des éléments de séquence d'insertion (IS) aux extrémités.

portent des gènes de mobilité (éléments IS, transposases,...).

sont des structures génétiques plus ou moins stables.

Par exemple, le chromosome de la souche uropathogène *E. coli* 536 contient quatre îlots de pathogénicité. Le premier îlot, PAI I<sub>536</sub>, contient des gènes codant pour une  $\alpha$ -hémolysine, deux adhésines similaires à F17 et à CS12. Le second îlot contient des gènes codant pour l'adhésine Hek, le fimbriae P, l' $\alpha$ -hémolysine et une adhésine similaire à une hémagglutinine. Les gènes du troisième îlot, PAI III<sub>536</sub>, codent pour le fimbriae S, le système de sidérophore Iro, l'adhésine Sap, une protéase similaire à Tsh et un récepteur héminique similaire à HmuR. PAI IV<sub>536</sub>, contient les gènes codant pour le système de sidérophore yersiniabactine (Dobrindt *et al.*, 2002).

## **2.2. Les facteurs d'adhésion.**

### **2.2.1. Morphologie.**

Les fimbriae (ou pili) sont les facteurs de virulence les plus connus impliqués dans les mécanismes de colonisation et d'adhésion. Ils permettent la colonisation du rumen, de l'intestin, de la cavité buccale et des voies urinaires (Hacker, 1992). Ce sont des appendices protéiques, hétéropolymériques, qui en microscopie électronique ressemblent à des cheveux à la surface bactérienne. Leur diamètre varie entre 2 et 10 nm (Kuehn *et al.*, 1992; Low *et al.*, 1996; Ottow, 1975). Les fimbriae peuvent être flexibles ou rigides (Kuehn *et al.*, 1992). Il existe de multiples fimbriae avec diverses propriétés d'adhésion. Une même bactérie est capable de synthétiser plusieurs types de fimbriae : CS31A, F165 et K99 sont produits par une souche O8 et une souche O23, CS31A, Pap<sub>31A</sub> et F17c sont produits par la souche 31A, F165<sub>1</sub> et AfaI sont produits par les souches O11 et O101 (Bertin *et al.*, 2000; Contrepolis *et*

*al.*, 1989; Maiti *et al.*, 1993). Les fimbriae sont plus fins et généralement plus courts et plus nombreux que les flagelles (entre 100 et 1000 fimbriae par bactérie). Ils sont généralement distribués de façon péritriche sur toute la surface bactérienne, à l'exception du pili type IV chez *Neisseria gonorrhoeae* ou *Pseudomonas aeruginosa* qui est distribué de façon polaire (Henrichsen, 1983; Low *et al.*, 1996; Whitchurch *et al.*, 1990). Le terme de « pili » est couramment utilisé comme synonyme de fimbriae, bien qu'initialement ce terme désigne des appendices comme les pili F, qui ont pour rôle de transférer de l'ADN d'une bactérie à l'autre lors de la conjugaison (Low *et al.*, 1996; Ottow, 1975).

Les fimbriae sont composés de sous-unités protéiques appelées fimbrines et dont la taille varie de 14 à 30 kDa. Une fimbriae contient différentes fimbrines, d'une part les sous-unités majeures, qui correspondent au type de fimbrines les plus nombreuses dans la constitution du fimbriae; d'autre part les sous-unités mineures, qui correspondent aux fimbrines les moins nombreuses. Les fimbrines se polymérisent en fibre, dans un ordre précis ce qui nécessite la participation d'autres protéines codées elles aussi par l'opéron fimbriaire.

Certaines fimbrines confèrent au micro-organisme la capacité de se lier spécifiquement soit à un type cellulaire cible par reconnaissance d'un récepteur cellulaire, comme le pili Pap ou type I, soit à des substrats présents dans le milieu comme la cellulose comme le pili de type IV de la bactérie à Gram positif *Ruminococcus albus*, soit à lui-même et on parle alors d'auto-aggrégation par exemple c'est le cas du pili BFP « Bundle Forming Pilus » (Bieber *et al.*, 1998; Dodson *et al.*, 2001; Rakotoarivonina *et al.*, 2002; Schrembi *et al.*, 2001). Ces fimbrines sont alors appelées adhésines (Tableau 2) (Low *et al.*, 1996).

Type F	Facteur d'adhésion	Adhésine	Récepteur	Type de résidu du récepteur	Cellule cible	Références
	Type I	FimH	uropodine la	$\alpha$ -D-Mannosides	endothélium humain de la vessie	Zhou <i>et al.</i> , 2001
F7-F16	Pap	PapGI	GbO3	$\alpha$ -D-galactosyl-(1-4)- $\beta$ -galactopyranose (=Gal-Gal)	endothélium vasculaire rénal	Hultgren <i>et al.</i> , 1993
		PapGII	GbO4	$\alpha$ -D-galactosyl-(1-4)- $\beta$ -galactopyranose + N-acétyl-galactosamine (=Gal-GalNAc)	endothélium vasculaire rénal	Dobson <i>et al.</i> , 2001
	Prs	PapGIII	GbO5	galactose-N-acétyl- $\alpha$ -(1-3)- $\beta$ -galactose-N-acétyl (=GalNAc-GalNAc)	endothélium vasculaire rénal	Dobson <i>et al.</i> , 2001
	F165.1	FooG	GbO5	galactose-N-acétyl- $\alpha$ -(1-3)- $\beta$ -galactose-N-acétyl (=GalNAc-GalNAc)	épithélium intestinal porcin	Fairbrother <i>et al.</i> , 1992
	F165.2	Fot		Gal-Gal	épithélium intestinal porcin	Dubreuil et Fairbrother, 1992
F5	K99	FanC		acide sialique	épithélium intestinal bovin, ovin, porcin	de Graaf <i>et al.</i> , 1980
F4	K88	FaeG		N-acétyl-D-galactosamine	épithélium intestinal porcin	Metcalfe <i>et al.</i> , 1991
	CS31A	CipG		acide N-acétylneuraminique	Int-407, Caco-2,	Di Martino <i>et al.</i> , 1995
	CF29K			acide N-acétylneuraminique	Int-407, Caco-2,	Di Martino <i>et al.</i> , 1995
F17c	20K	GafD		N-acétyl-D-glucosamine	villosités de bordure en brosse de veau et agneau	Tanskanen <i>et al.</i> , 2001
F1C	F1C	Foc	GgO3Cer	ganglioside	endothélium rénal et de la rate	Khan <i>et al.</i> , 2000
	S	SfaS?		acide sialique	erythrocyte humain et bovin	Morschhäuser <i>et al.</i> , 1993
	Curli	CsgA	CMH I, fibronectine, laminine		Hep-2, Hela, lymphocyte T	Hammar <i>et al.</i> , 1996

**Tableau 2:** Liste et caractéristiques de facteurs d'adhésion produits par *E. coli*. D'après Bousquet, 1994

Une même adhésine peut fournir plusieurs variants. Dans le cas de PapG on retrouve trois variants GI, GII et GIII. Les trois variants, ou allèles, présentent des changements subtils dans les préférences de récepteurs (Marklund *et al.*, 1992; Stromberg *et al.*, 1990). Ces différences pourraient expliquer la prédominance de l'allèle III chez les *E.coli* isolés à partir d'enfants ou de femmes présentant une cystite alors que l'allèle II est prédominant chez les souches isolées de cas de pyélonéphrites chez les femmes et les enfants (Johanson *et al.*, 1993; Johnson et Brown, 1996; Johnson *et al.*, 1998; Otto *et al.*, 1993). On connaît la structure tridimensionnelle du variant II de l'adhésine PapG, dont le domaine situé à l'extrémité amino-terminale reconnaît le récepteur cellulaire globotriasylcéramide (GbO4) (Dodson *et al.*, 2001). Certains fimbriae sont en forme d'hélices creuses avec l'adhésine au sommet, comme le type I et le pili P, d'autres sont des fibres étirées flexibles sans cavité axiale avec des adhésines tout le long de la structure, comme K88 et K99 (Low *et al.*, 1996). Chez les souches d'*E. coli* intestinales les adhésines sont souvent des sous-unités majeures alors que chez les *E. coli* extra-intestinales les adhésines sont en général des sous-unités mineures (Hacker, 1992). Les fimbriae ne sont, en général, pas impliqués dans la mobilité des bactéries.

Il existe des adhésines afimbriaires, dont la structure n'est pas connue. Par exemple dans le cas de CS31A, cette adhésine recouvre toute la surface bactérienne et sa structure ressemble aux capsules polysaccharidiques bien qu'uniquement protéique (Girardeau *et al.*, 1988). Les adhésines de type AFA (AFA I, II, III, IV) sont produits par des *E. coli* uropathogènes (Le Bouguénec et Bertin, 1999). L'adhésine afimbriare AFA-I est responsable de la colonisation de l'épithélium urinaire notamment via l'adhésine AfaE (Labigne-Roussel *et al.*, 1984; Le Bouguénec et Bertin, 1999).

### **2.2.2. Classification.**

Il existe plusieurs classifications des fimbriae, mais à l'heure actuelle aucune n'est unanimement utilisée. Les fimbriae ont d'abord été classés selon leur morphologie, selon leur sérologie, puis selon leur capacité à agglutiner différents érythrocytes animaux, leur composition chimique et le type de récepteur reconnu.

D'un point de vue structural, il existe deux catégories de facteurs d'adhésion. Le type 1 regroupe des fimbriae rigides de 7-10 nm de diamètre, dont les sous-unités constitutives sont distinctes des sous-unités responsables de l'adhésion, comme le pili P et le fimbriae 987P (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1993; Khan et Schifferli, 1994). Le type 2 regroupe de fins filaments flexibles (fibrilles), de 2 nm de diamètre. Ils recouvrent la surface bactérienne et seraient principalement constitués de l'adhésine, comme CS31A, AfaI, AfaIII (Garcia *et al.*, 1996; Girardeau *et al.*, 1988; Labigne-Roussel *et al.*, 1984).

La classification selon les types F est basée sur les propriétés antigéniques des fimbriae, et on dénote 17 types (Ørskov et Ørskov, 1990).

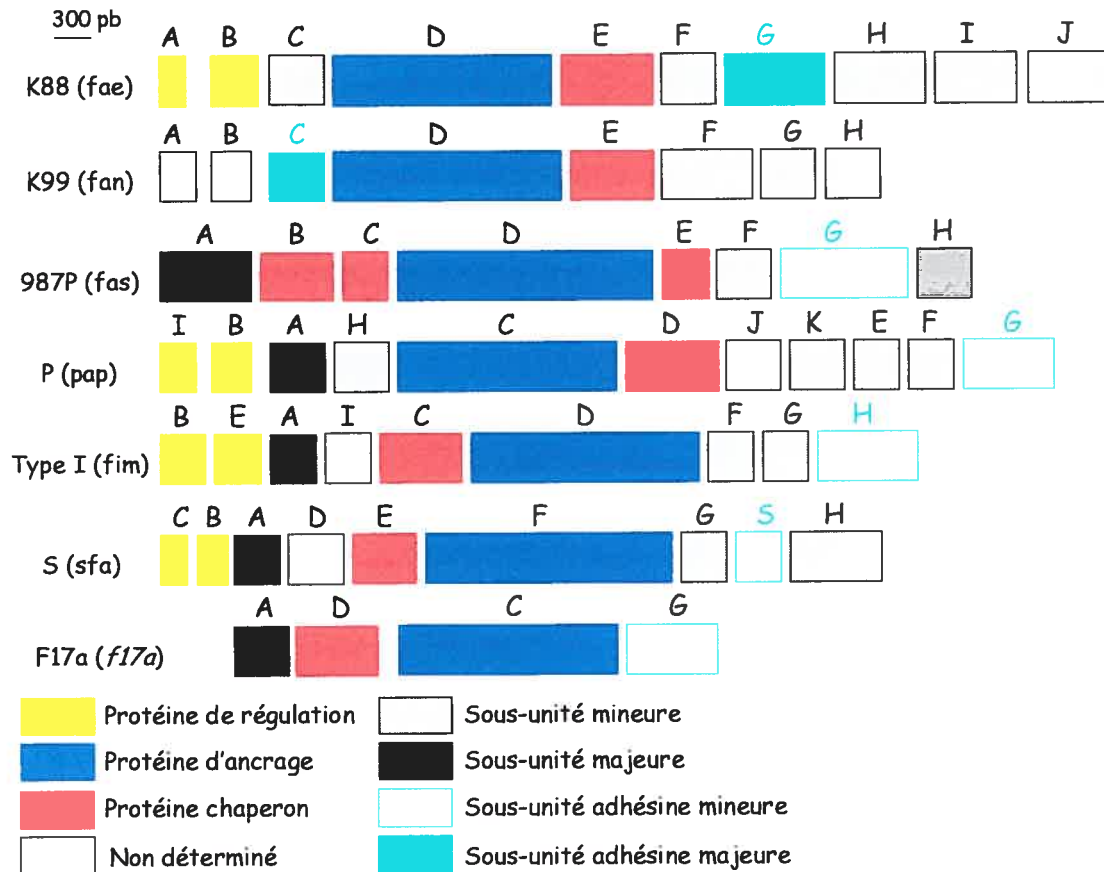
Une troisième classification basée sur les propriétés adhésives divise en deux grands groupes les fimbriae. Les *E. coli*, synthétisant des fimbriae, agglutinent les globules rouges de diverses espèces. Or certains fimbriae lient des récepteurs contenant du mannose et l'hémagglutination est inhibée en présence de mannose dans le milieu environnant. Ces fimbriae, du premier groupe, sont alors dits sensibles au mannose (MS). Jusqu'à présent, les seules protéines identifiées capables de lier du mannose chez les bactéries sont le fimbriae type I de *E. coli* et la lectine PA-IIL de *P. aeruginosa* (Lerrer et Gilboa-Garber, 2001; Schrembi *et al.*, 2001). Le second groupe contient les fimbriae dits résistants au mannose (MR) car ils permettent l'agglutination des globules rouges même en présence de mannose. Ce groupe contient tous les autres fimbriae. Toutefois, il existe des adhésines comme celles de 987P et de type 1C qui n'agglutinent pas les érythrocytes même si elles fixent les cellules eucaryotes (Hacker, 1992).

### **2.2.3. Organisation génétique.**

La biogenèse des fimbriae est un processus complexe dans lequel interviennent plusieurs protéines dont les gènes sont le plus souvent regroupés à un même locus, à l'exception de Curli de *E. coli*. En effet, la production de cette structure fibreuse requiert la transcription de deux opérons distincts *csgAB* et *csgDEFG*. Ces gènes codent pour l'adhésine CsgA, le nucléateur CsgB, l'activateur transcriptionnel CsgD, les protéines chaperon CsgE et CsgF et la lipoprotéine CsgG qui va s'intégrer dans la membrane externe. L'opéron *csgDEFG* est situé en amont de *csgAB*. Ces deux opérons sont transcrits de façon

divergente (Chapman *et al.*, 2002). Les autres gènes fimbriaux sont organisés en opérons, plasmidique ou chromosomique.

L'analyse moléculaire approfondie des opérons fimbriaires (*pap*, *fim*, *sfa*, *fl7*) ou d'adhésines non associées à une structure filamenteuse (*clp*) a été effectuée, après clonage, construction de mutants, étude de l'expression des gènes en maxicellules ou minicellules et détermination des séquences nucléotidiques, (Fig. 2) (Klemm et Christiansen, 1987; Martin *et al.*, 1991; Morschhäuser *et al.*, 1993b; Norgren *et al.*, 1984). Ces opérons contiennent les gènes codant pour les fimbrines et les adhésines, les protéines du système d'assemblage et les protéines chaperons. Ils contiennent souvent également une ou plusieurs protéines régulatrices. L'organisation de ces gènes varie selon les opérons mais de manière générale on trouve en 5' les gènes codant pour les protéines régulatrices, puis les gènes des protéines chaperons et du système d'ancrage, et enfin les gènes codant pour les sous-unités constitutives du facteur d'adhésion. Toutefois, la production du fimbriae F17 requiert seulement un groupe de quatre gènes *fl7*. Aucun ne code pour une protéine régulatrice (Le Bouguénec et Bertin, 1999).

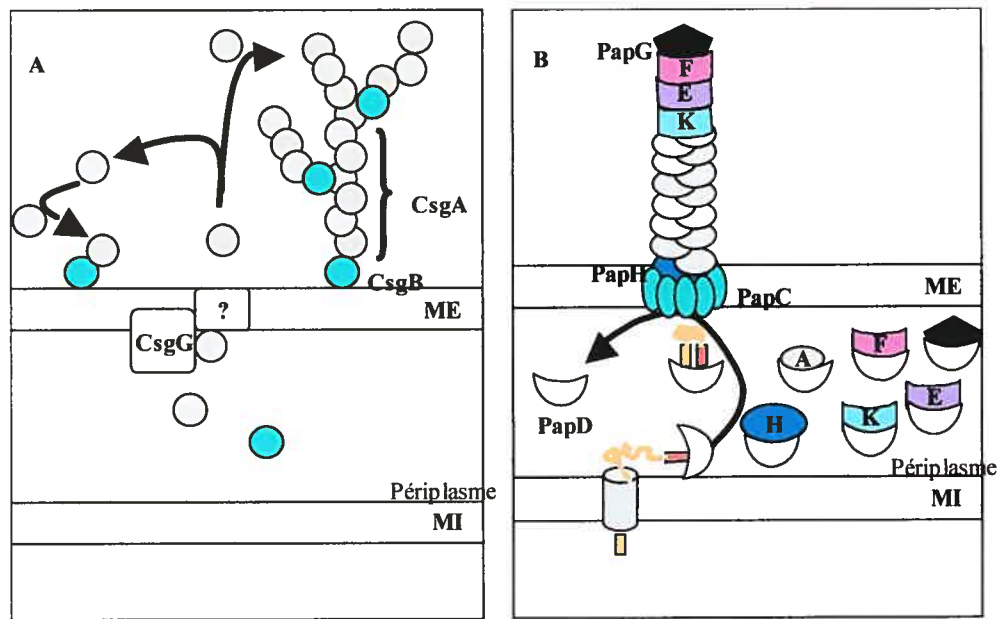


**Fig. 2:** Cartes des gènes codant pour la biogenèse des fimbriae K88, K99, 987P, P, type I, S et F17a. D'après Méchin, 1994.

#### 2.2.4. Modèle de biogenèse.

Il existe plusieurs modes de polymérisation des facteurs d'adhésion à la surface des bactéries à Gram négatif, (Fig. 3) (Soto et Hultgren, 1999). Dans ce chapitre seulement deux modes sont présentés. La structure de CS31A et de F165<sub>1</sub> à la surface bactérienne (chapitre 3.2., Fig. 6) s'apparente respectivement à celle de Curli et du pili Pap. F165<sub>1</sub> et Pap présentent des homologies protéiques entre leur sous-unités. Ainsi, les modes d'assemblage de Curli et du pili Pap pourraient correspondre au modes de biogenèse de CS31A et de F165<sub>1</sub> respectivement.

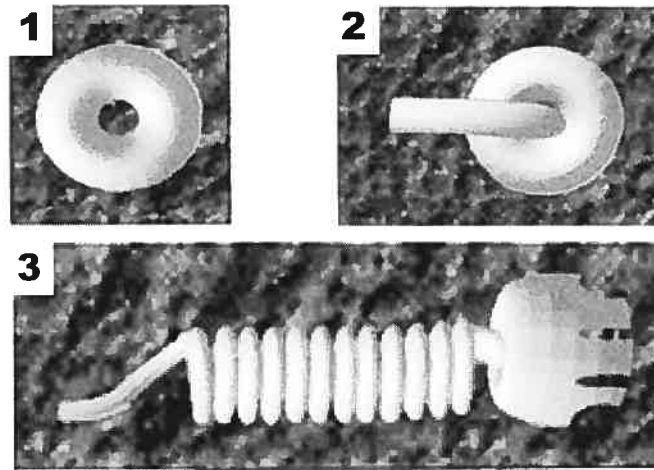




**Fig. 3** : Mode d'assemblage des facteurs d'adhésion Curli et Pap de *E. coli*. (A) Assemblage du facteur d'adhésion Curli de *E. coli* par le mode de précipitation-nucléation extracellulaire. Curli est constitué des sous-unités CsgA et CsgB, CsgG est ancrée dans la membrane externe et permet la sécrétion des deux sous-unités. (B) Assemblage du pili Pap de *E. coli* via le système de protéines chaperon et d'ancrage. Chaque sous-unité est indiquée, PapD est la protéine chaperon et les sous-unités PapC constituent le système d'ancrage dans la membrane externe. D'après Soto et Hultgren, 1999.

Les protéines constitutives des facteurs d'adhésion doivent traverser la membrane interne, le périplasme et enfin la membrane externe pour être exposées sous forme polymérisée à la surface bactérienne. La biosynthèse de Curli se fait par le mode de polymérisation appelé précipitation-nucléation extracellulaire. Les protéines CsgE, CsgF et CsgG, une lipoprotéine, sont homologues aux protéines chaperons et permettraient de diriger les sous-unités CsgA et CsgB sécrétées dans le périplasme vers la membrane externe. CsgA et CsgB seront ensuite sécrétées à l'extérieur du microorganisme, à l'aide d'un facteur inconnu. CsgB, le composé mineur nommé nucléateur, a la capacité de précipiter les protéines CsgA qui se polymérisent en facteur d'adhésion, à la fois à la surface bactérienne mais aussi en se connectant au polymère de CsgA pour former des branches de polymères CsgA (Chapman *et al.*, 2002; Soto et Hultgren, 1999).

Le deuxième mode est celui du système d'assemblage via les protéines chaperon-ancrage, il a été décrit en détail pour le pili Pap. La production en surface de Pap fait intervenir la protéine chaperon périplasmique PapD et la protéine d'ancrage PapC de la membrane externe. PapD permet le transport de chaque sous-unité vers la membrane externe jusqu'à la protéine d'ancrage (Dodson *et al.*, 1993; Hultgren *et al.*, 1993). PapC permet la polymérisation des sous-unités entre elles et leur passage à travers la membrane externe (Dodson *et al.*, 1993). Le mode d'assemblage via le couple protéine chaperon/protéine d'ancrage est utilisé pour au moins 30 facteurs d'adhésion (Thanassi *et al.*, 1998). Le pili Pap est composé de six sous-unités majeures et mineures: PapG est l'adhésine située à l'extrémité du pili, PapF est un adaptateur qui connecte PapG à la fine extrémité du pili, PapE est le composant principale de cette extrémité (2 nm de diamètre), PapK connecte l'extrémité du pili au corps, PapA constitue ce corps de 10 nm de diamètre et PapH permet de maintenir le pili accroché à la membrane externe (Båga *et al.*, 1987; Jacob-Dubuisson *et al.*, 1993; Kuehn *et al.*, 1992; Thanassi *et al.*, 1998). Chaque complexe chaperon /sous-unité est dirigé vers le système d'ancrage de la membrane externe. Le système d'ancrage, un pore composé de six à douze PapC, permet le passage de chaque sous-unité à travers la membrane externe sans nécessité d'ATP. Le pore a diamètre de 2 à 3nm (Norgren *et al.*, 1987). Si l'extrémité du pili Pap passe dans ce diamètre, le corps du pili, trop large pour passer, doit subir une linéarisation des sous-unités majeures PapA, qui alors ne forment plus que 2 nm de diamètre. D'après une étude microscopique réalisée sur le fimbriae type I, on peut supposer qu'une fois en surface, PapA, comme FimA, reprend sa structure tridimensionnelle en baguette et forme l'hélice du pili P, (Fig. 4) (Saulino *et al.*, 2000).



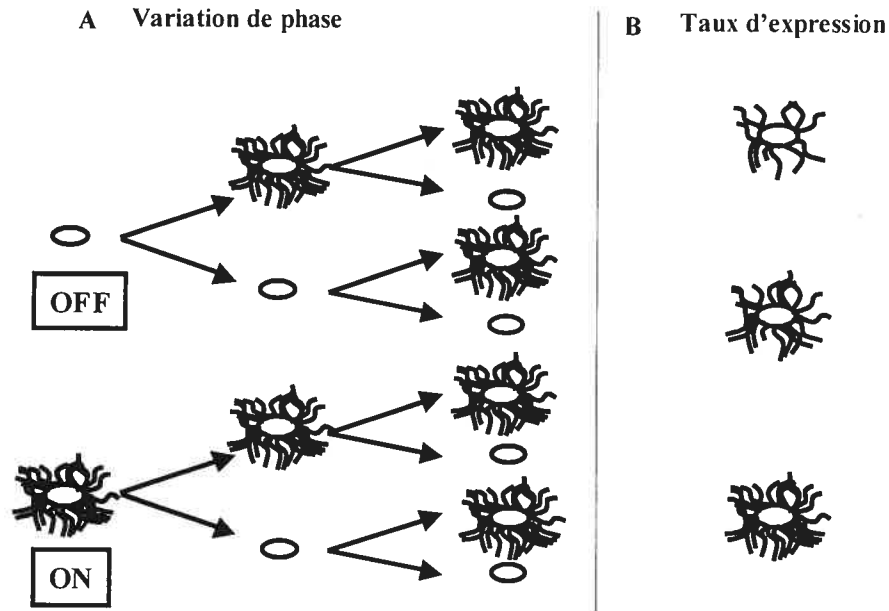
**Fig. 4:** Images obtenues à la suite de la digitalisation des images en microscopie électronique du système d'assemblage du pili type I à partir de la protéine d'ancrage. (1) Le complexe protéique d'ancrage est inséré dans la membrane externe, vu du dessus. (2) Sortie de la fibre protéique sous forme linéarisée à travers le complexe d'ancrage. (3) Vu de profil montrant l'obtention de la structure hélicoïdale du pili une fois à la surface. Tiré de Saulino *et al.*, 2000.

L'étude de la structure du pili et de sa polymérisation chez des mutant PapK négatifs, et/ou PapF négatifs, ou surproduisant PapK, PapE, PapH ou PapA, a démontré que l'ordre de polymérisation des sous-unités est bien établi, de même que la longueur de l'extrémité et du corps du pili (Bäga *et al.*, 1987; Jacob-Dubuisson *et al.*, 1993; Kuehn *et al.*, 1992; Lindberg *et al.*, 1986). A chaque interaction la « fibre polymérique » est poussée à la surface bactérienne et une fois que le corps du pili apparaît, celui-ci commence à adopter sa structure hélicoïdale (Saulino *et al.*, 2000). Actuellement, on ne sait pas s'il existe une interaction entre PapC et PapD pour réaliser la polymérisation.

#### **2.2.5. Généralités sur la régulation de la synthèse des facteurs d'adhésion.**

La synthèse des facteurs d'adhésion est soumise à une régulation complexe en réponse à différents stimuli environnementaux. Il existe plusieurs niveaux de régulation.

Le premier est transcriptionnel, il contrôle l'activité du promoteur, influençant le taux de transcription, et est responsable du phénomène de la variation de phase, (Fig. 5). Ces deux mécanismes de régulation sont décrits dans les paragraphes 2.2.6.1 et 2.2.6.2. Si tous les opérons codant pour des fimbriae voient leur niveau d'expression régulé, tous les facteurs d'adhésion ne sont pas soumis au mécanisme de variation de phase, comme par exemple K88 et K99 (Blyn *et al.*, 1989; Huisman *et al.*, 1994).



**Fig. 5** : Schéma de deux types de régulation transcriptionnelle : La variation de phase et le taux d'expression. (A) La variation de phase. Une bactérie synthétisant les fimbriae est dite en phase ON. Une bactérie ne produisant pas de fimbriae est dite en phase OFF. Quelle que soit sa phase, une bactérie se divise en bactéries en phase ON et/ou en phase OFF. (B) Le taux d'expression. Une bactérie en phase ON, va produire selon les stimuli environnementaux plus ou moins de fimbriae à sa surface.

Le second niveau de régulation est le niveau post-transcriptionnel. Båga et collaborateurs ont démontré que les quantités des ARN messagers de *papB* et *papA*, sont différentes. Les gènes *papB* et *papA* sont co-transcrits en un long messenger qui subit un clivage endo-nucléotidique libérant deux messagers. Le messenger de *papA*, du fait d'une séquence terminateur à son extrémité 3', est plus stable que celui de *papB* qui, lui, est presque instantanément dégradé par des exonucléases. Finalement, on trouve 100 fois plus

d'ARN *papA* que de cotranscrit *papBA* dans la bactérie (Båga *et al.*, 1988). Un autre exemple est celui du fimbriae F1845 codé par l'opéron *daa*. Le gène codant pour la sous-unité majeure DaaE, est cotranscrit avec *daaC* et *daaD*. Suite à un clivage endoribonucléotidique en 5', l'ARN messenger *daaE* est obtenu. Alors que les RNAses III et E dégradent l'autre partie du messenger polycistronique, une structure en boucle à l'extrémité 3' du messenger *daaE*, le protège de la dégradation (Bilge *et al.*, 1993).

La production en surface des fimbriae est régulée par un mécanisme post traductionnel qui constitue le troisième niveau de régulation possible. Par exemple, il existe une gestion du stock des sous-unités arrivant dans le périplasma dans la biosynthèse du pili P. En effet, la protéase périplasmique DegP dégrade les agrégats de sous-unités non complexées aux protéines chaperons. Or, les *E. coli* ne possédant pas DegP subissent l'accumulation des sous-unités agrégées, qui est létale (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1997). Autre exemple, les altérations tridimensionnelles des sous-unités dans le périplasma jouent aussi un rôle dans le contrôle de la production du pili P. En effet, DsbA catalyse la formation de ponts disulfures nécessaires à l'assemblage du pili P (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1994). La transcription des gènes codant pour DegP et DsbA est activée par le système à deux composants CpxAR, lui-même activé en réponse à l'accumulation périplasmique des sous-unités mal conformées et non couplée à la protéine chaperon (Danese et Silhavy, 1997; Hung *et al.*, 2001; Podigliano *et al.*, 1997). Or CpxAR permet aussi de renforcer la production du pili Pap en maintenant en phase ON l'opéron *pap* (Hung *et al.*, 2001).

#### **2.2.5.1. Régulation du niveau d'activité du promoteur.**

La régulation du taux de transcription permet de contrôler la quantité d'ARN messagers produits par une bactérie, et donc finalement la quantité de fimbriae produit à sa surface. Des interactions entre l'ADN et les protéines permettent l'activation ou la répression du promoteur cible. On parle alors de régulation en trans. Ces protéines régulatrices sont parfois codées par l'opéron lui-même, permettant une autorégulation (Blomfield, 2001). D'autres sont des régulateurs globaux du métabolisme bactérien, comme

Lrp, CRP, H-NS (Harel et Martin, 1999). Cependant, les signaux environnementaux qui contrôlent l'expression des facteurs de virulence et la façon dont le signal est transmis à la bactérie sont encore mal connus. Une description plus détaillée des régulateurs que nous supposons être impliqués dans les régulations environnementales modulant la production des deux facteurs d'adhésion étudiés (CS31A et F165<sub>1</sub>) se situe dans le chapitre 5.

#### **2.2.5.2. Le phénomène de la variation de phase.**

La variation de phase contrôle le pourcentage de bactéries qui synthétisent (phase ON) ou ne synthétisent pas (phase OFF) le facteur de virulence au sein d'une même colonie. De plus, une bactérie mère peut donner dans sa descendance des cellules soit en phase ON soit en phase OFF, quel que soit son phénotype. Cette régulation s'exerce au niveau transcriptionnel.

La variation de phase se traduit par une haute fréquence de transition entre les phases ON et OFF (Henderson *et al.*, 1999). Elle est réversible, se produit généralement à une fréquence supérieure à  $10^{-5}$  par génération et résulte en une population phénotypiquement hétérogène (Henderson *et al.*, 1999). La variation de phase se produit chez différentes espèces bactériennes, où elle régule entre autres l'expression de diverses structures de surface chez les bactéries à Gram-négatif, particulièrement celle des fimbriae, des flagelles, de certaines protéines de la membrane externe, des capsules et des lipopolysaccharides (LPS) (Hallet, 2001; Henderson *et al.*, 1999). Par exemple, les fimbriae type I et S de *E. coli*, les flagelles de *Salmonella typhimurium*, la protéine membranaire Opc de *N. meningitidis*, la capsule de *N. meningitidis*, le LPS de *Haemophilus influenzae*, ainsi que les LOS (lipooligosaccharide) de *N. meningitidis* sont soumis à cette régulation (Hammerschmidt *et al.*, 1996; Leathart et Gally, 1998; Morschhäuser *et al.*, 1993a; Sarkari *et al.*, 1994; Zieg *et al.*, 1977; Berrington *et al.*, 2002; Humphries et High, 2002). Biologiquement, la variation de phase, parce qu'elle conduit à la création d'une population mixte présentant une hétérogénéité phénotypique, pourrait constituer une stratégie adaptative aux conditions environnementales sans cesse changeantes (milieu extérieur et

hôte) et donc favoriser la survie du micro-organisme (Andrews, 1995; Dybvig, 1993; Lim *et al.*, 1998; Mekalanos, 1992; Saunders, 1986).

Plusieurs mécanismes moléculaires peuvent rendre compte de la variation de phase (Henderson *et al.*, 1999). La variation de phase peut s'opérer par l'entremise de réarrangements génomiques, tels que (i) l'inversion site-spécifique d'un fragment d'ADN (ex.: fimbriae type 1 de *E. coli* (Abraham *et al.*, 1985)); flagelle de *Salmonella typhimurium* (Johnson et Simon, 1985; Zieg *et al.*, 1977), (ii) des systèmes de recombinaisons complexes impliquant la recombinaison homologue RecA dépendante (ex. : pili de type IV de *Neisseria gonorrhoeae*) (Seifert, 1996; Swanson *et al.*, 1986), qui conduisent souvent à des délétions, des duplications ou des transferts de gènes. La variation de phase peut aussi être accomplie par un mauvais appariement des brins d'ADN lors d'un glissement (« slipped-strand mispairing »), un mécanisme RecA indépendant causé par un mauvais appariement transitoire, lors de la réplication, de séquences répétées d'ADN (SSRs : « short tandem repeats »; ou VNTRs : « variable number of tandem repeats ») (Chandler et Fayet, 1993; van Belkum *et al.*, 1998). Une altération dans les régions SSRs, lorsqu'elles sont localisées en amont d'un gène, influence la transcription alors que lorsque ces régions sont situées à l'intérieur d'un gène, l'altération modifie le cadre de lecture ouvert transcriptionnel (ex. : *opaC* de *N. gonorrhoeae*; *opc* de *N. meningitidis*) (Meyer *et al.*, 1990). Enfin, la variation de phase médiée par la méthylation différentielle est un mécanisme épigénétique (Blyn *et al.*, 1990; van der Woude *et al.*, 1996) puisque seuls les phénotypes et non les génotypes sont altérés : l'intégrité du génome est maintenue tandis que diverses protéines régulatrices agissent de concert en vue de modifier la transcription du gène sujet à la variation de phase. Ce mécanisme est impliqué pour la régulation transcriptionnelle des opérons *pap*, *sfa*...

#### **2.2.6. Interactions hôte-pathogène.**

L'interaction hôte-pathogène déclenche des réponses d'une part de l'hôte et d'autre part de la bactérie. Du côté de la cellule eucaryote, il a été démontré que le fimbriae P stimule la production de cytokines cellulaire, indépendamment du LPS et de CD14, via le

récepteur Toll-like 4 (TLR 4) (Freundéus *et al.*, 2001). *In vivo*, une souris déficiente pour TLR 4 est incapable de répondre à l'infection urinaire d'une souche *E. coli* produisant le pili P. De plus, le fimbriae type I peut, lui aussi, stimuler la réponse inflammatoire de l'hôte en permettant l'interaction du LPS avec le récepteur TLR 4 indépendamment de CD14 (Hedlund *et al.*, 2001). Trois autres facteurs d'adhésion de pathogènes oraux déclenchent la production de TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  par les cellules humaines mononucléaires différenciées THP-1 : la sous-unités fimbriaire majeure FimA de *Porphyromonas gingivalis*, l'adhésine BspA de *Bacteroides forsythus* et l'adhésine AgI/II de *Streptococcus mutans*. L'induction des deux cytokines dépend des récepteurs cellulaires CD14 et TLR4 pour FimA et AgI/II, alors que pour BspA cela dépend de CD14 et TLR2 (Hajishengallis *et al.*, 2002). Du côté bactérien, la fixation via l'adhésine PapG à son récepteur rénal eucaryote stimule la transcription du gène codant pour le régulateur-senseur AirS. AirS régule la synthèse d'un système d'acquisition du fer par les *E.coli* uropathogènes (Pernstig *et al.*, 2000). De plus, l'interaction hôte-pathogène dans le tractus urinaire déclenche une cascade de défenses innées comme la production d'oxyde nitrique qui peut induire des stress périplasmiques chez *E. coli*. Le système de transduction du signal à deux composants CpxAR contrôle la réponse bactérienne aux stress extra-cytoplasmiques tels que des altérations de la membrane interne, un pH élevé, surproduction de NlpE et l'agrégation périplasmique de protéines mal formées (Snyder *et al.*, 1995). D'une part CpxAR renforce la production du pili P en activant l'expression de gènes codant pour des protéines périplasmiques nécessaire à l'assemblage du pili et en maintenant en phase ON l'opéron *pap*, ce qui permet d'assurer la colonisation de l'épithélium et la persistance de la souche (Hung *et al.*, 2001). D'autre part, CpxAR pourrait être à l'origine de l'activation de plusieurs autres facteurs de virulence comme l'hémolysine, le facteur nécrosant cytotoxique et le fimbriae type I, puisque la séquence consensus de CpxR a été trouvée dans les régions régulatrices des gènes codant pour ces facteurs (Hung *et al.*, 2001).

### 2.2.7. Conclusions.

Les études sur les systèmes d'adhésion bactérienne ont été largement stimulées par les répercussions cliniques possibles dans la prévention ou la guérison de certaines maladies infectieuses dont nous avons parlé précédemment. Comme les fimbriae jouent un



rôle primordial dans ces mécanismes de pathogénèse, ils apparaissent effectivement comme une cible de choix dans la lutte contre les infections provoquées par les bactéries exprimant ces structures. Ainsi différentes démarches pour inhiber l'adhésion ont été abordées :

- obtenir une inhibition *in vivo* de la synthèse des adhésines bactériennes. Cette voie, peu étudiée en production animale pourrait prendre de l'importance en santé humaine face au nombre croissant de souches résistantes aux antibiotiques et face à l'élargissement croissant du spectre de résistance de ces mêmes souches.
- obtenir une inhibition compétitive de l'adhésion à l'aide de récepteurs purifiés analogues à ceux reconnus par les adhésines.
- inhiber l'attachement par des anticorps dirigés contre la fimbrine majeure ou l'adhésine. Cette dernière approche a conduit à des applications concrètes dans le secteur vétérinaire. La formule vaccinale tient compte des différentes valences correspondant aux principales adhésines et est administrée aux mères gestantes qui transmettent aux nouveau-nés les anticorps anti-adhésines par le colostrum. Le laboratoire de microbiologie de l'INRA de Theix (France) a ainsi développé en collaboration avec Rhône-Mérieux le vaccin « Immocolibov » qui confère une protection passive aux veaux nouveau-nés contre les diarrhées provoquées par des *E. coli* exposant les antigènes K99, F41, F17c et CS31A.

### **3. GENERALITES SUR F165<sub>1</sub> ET CS31A.**

Ce chapitre présente les caractéristiques essentielles des antigènes polymériques F165<sub>1</sub> et CS31A, ainsi que les données de la régulation transcriptionnelle des opérons *foo* et *clp*.

#### **3.1. Epidémiologie et pathogénicité.**

En France, au Canada et en Inde F165 est retrouvé en moyenne chez 35% de veaux morts en état de bactériémie colibacillaire. Au Canada, F165 est retrouvé respectivement

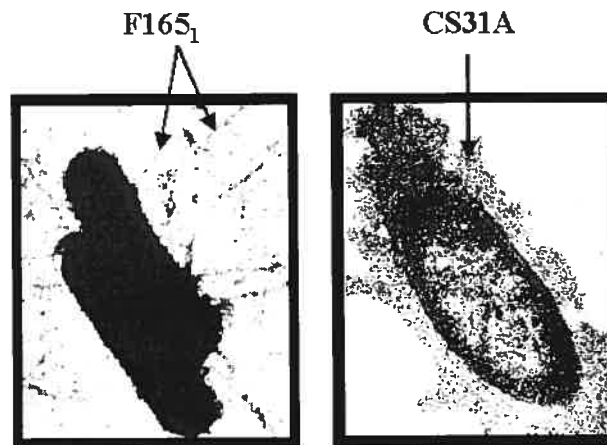
chez 14% des porcelets infectés (Contrepolis *et al.*, 1989). F165 est un complexe formé de deux fimbriae F165<sub>1</sub> et F165<sub>2</sub> (Harel *et al.*, 1991; Harel *et al.*, 1992b; Harel *et al.*, 1995). L'antigène de surface F165<sub>1</sub> a été mis en évidence initialement chez des souches d'*E. coli* non-entérotoxigènes isolées de diarrhées et de septicémies chez le porcelet (Contrepolis *et al.*, 1989; Fairbrother *et al.*, 1986; Ngeleka *et al.*, 1993; Ngeleka *et al.*, 1994). Les souches F165<sub>1</sub> positives appartiennent souvent aux sérogroupes O4, O7, O8, O9, O11, O13, O15, O17, O18, O20, O23, O24, O25, O78, O86, O101, O115, O117, O139, O141, O149 et O153 (Contrepolis *et al.*, 1989; Maiti *et al.*, 1993). F165<sub>1</sub> a aussi été identifié chez des *E. coli* septicémiques humaines, majoritairement de type O4 et O6 pour F165<sub>1</sub> (Cherifi *et al.*, 1990). Le rôle exact de F165<sub>1</sub> n'est pas connu. Des infections expérimentales de porcelets avec la souche sauvage ou des mutants F165<sub>1</sub> négatifs suggèrent que F165<sub>1</sub> permet aux bactéries productrices de coloniser les organes extra-intestinaux et de résister à la phagocytose (Ngeleka *et al.*, 1993; Ngeleka *et al.*, 1994; Ngeleka et Fairbrother, 1999). Des tests d'adhésion *in vitro* ont démontré que F165<sub>1</sub> permet aux *E. coli* d'adhérer aux cellules MDCK-II (cellules épithéliales rénales canines) et LLC-PK1 (cellules tubulo-épithéliales porcines) (Béka, 1998).

L'antigène de surface CS31A, pour « Coli Surface associated Antigène », a été mis en évidence chez des souches d'*E. coli* entérotoxigènes responsables de diarrhées et de septicémies chez le jeune veau, chez des *E. coli* responsables de diarrhées chez la chèvre (Bertin *et al.*, 1998; Bertin *et al.*, 2000; Contrepolis *et al.*, 1993; Girardeau *et al.*, 1988). CS31A est retrouvé en moyenne chez 37% de veaux morts en état de bactériémie colibacillaire en France, au Canada et en Inde, et chez 1% des porcelets infectés au Canada (Contrepolis *et al.*, 1989). On retrouve aussi CS31A chez 5% des *E. coli* isolées à partir de selles humaines chez des patients présentant une diarrhée (Bertin *et al.*, 2000; Jallat *et al.*, 1994). Ces *E. coli* font partie des DAEC (diffusely adhering *E. coli*) (Jallat *et al.*, 1994). De plus, CF29K, un homologue de CS31A, est produit par des *Klebsiella pneumoniae* responsables d'infections nosocomiales humaines (Di Martino *et al.*, 1995). CF29K (ou CS31A-L) et CS31A ne diffèrent que par la sous-unités majeure, où un seul acide aminé est modifié : . Comme CS31A, CF29K adhère aux cellules Caco-2 et Henle-407 mais aussi aux cellules MDCK (Contrepolis *et al.*, 1993; Korth *et al.*, 1994). CS31A a été caractérisé à partir de la souche 31A, isolée des fèces d'un veau diarrhéique (Girardeau *et al.*, 1988). Des test d'infection expérimentale avec la souche 31A, chez des veaux gnotobiotiques n'ayant

pas bu le colostrum ont démontré que 31A cause une septicémie avec un œdème rénale qui est suivit de la mort des animaux en moins de 48h (Contrepolis *et al.*, 1986). Les souches d'*E. coli* produisant CS31A appartiennent souvent aux sérogroupes O2, O4, O7, O8, O9, O11, O13, O15, O17, O20, O21, O23, O25, O78, O86, O87, O101, O117, O134, O139, O141, O153, O157 et O161, fréquemment associés aux bactéries isolées de veaux en état de septicémie, et présentent une certaine parenté clonale (Contrepolis *et al.*, 1989; Contrepolis *et al.*, 1993). CS31A a aussi été identifié chez des *E.coli* septicémiques humaines, majoritairement de type O78 (Cherifi *et al.*, 1990). CS31A présente de fortes homologues génétiques et immunologiques avec d'autres facteurs d'adhésion (K88, F41) (Girardeau *et al.*, 1988; Girardeau *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1991) ce qui laisse présumer un rôle dans la colonisation. De plus, CS31A adhère à certaines lignées cellulaires intestinales, comme les cellules différenciées Caco-2 ou les cellules non différenciées Henle 407 (Di Martino *et al.*, 1997; Jallat *et al.*, 1994). Cependant, le récepteur de CS31A n'a pas été identifié (Di Martino *et al.*, 1995; Jallat *et al.*, 1994).

### 3.2. Morphologie.

F165<sub>1</sub> est un constituant du complexe F165, qui est formé des deux fimbriae F165<sub>1</sub> et F165<sub>2</sub> (Harel *et al.*, 1991; Harel *et al.*, 1992a; Harel *et al.*, 1995). F165 se présente comme un long fimbriae rigide dont le diamètre fait 4-6 nm et la longueur est supérieure à 200 nm (Fig. 6) (Fairbrother *et al.*, 1986; Fairbrother *et al.*, 1988). Le fimbriae F165<sub>1</sub> présente de fortes homologues avec les fimbriae P (F11), il contient une adhésine G de classe III, montrant une hémagglutination résistante au mannose (MRHA), s'apparentant à la famille Prs (F13). Cette adhésine reconnaît les récepteurs GBO5 des cellules eucaryotes (Fairbrother *et al.*, 1986; Harel *et al.*, 1992b).



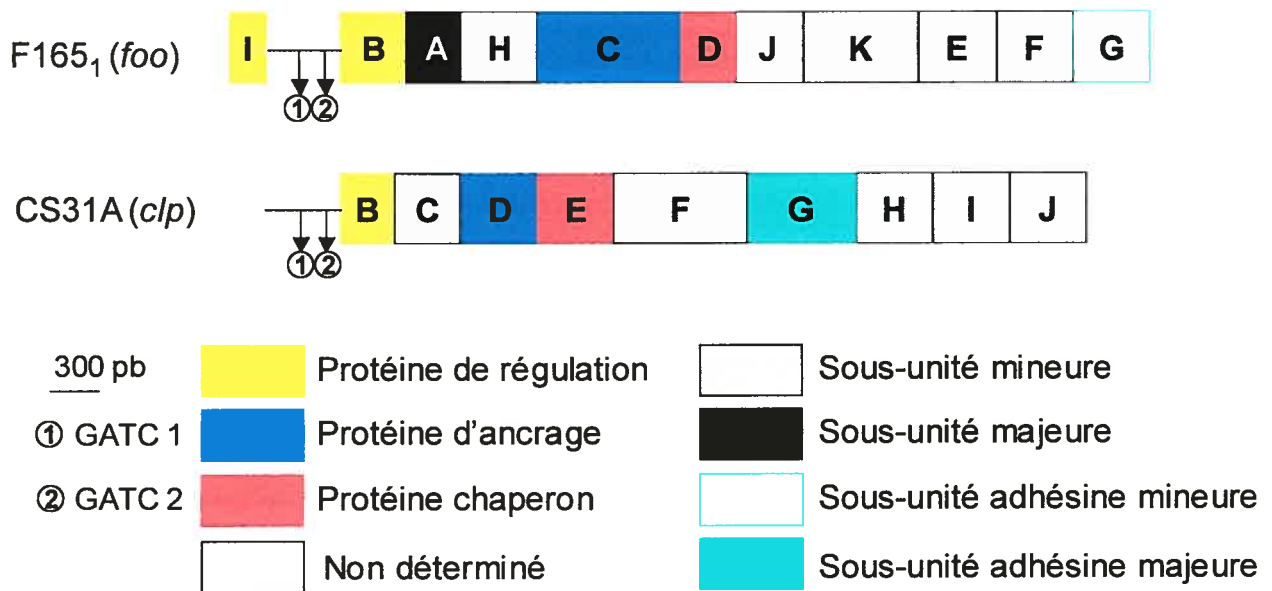
**Fig. 6 :** Visualisation microscopique de F165 et CS31A à la surface de *E. coli* par immunomarquage à l'or et à la ferritine respectivement. F165 est un complexe formé des fimbriae F165<sub>1</sub> et F165<sub>2</sub>. CS31A entoure complètement les corps bactériens à la manière d'une capsule, bien qu'il soit constitué d'un hétéropolymère. Tiré de Girardeau *et al.*, 1988 et Harel *et al.*, 1992b.

CS31A est un facteur d'adhésion afimbriaire présentant de fortes homologues génétiques avec les fimbriae K88, il contient une adhésine (ClpG). L'adhésine est la protéine majeure, qui lie les récepteurs cellulaires contenant des groupements N-acétylneuraminiques (Di Martino *et al.*, 1995; Di Martino *et al.*, 1997; Girardeau *et al.*, 1988). En microscopie électronique, on observe que CS31A recouvre entièrement les corps bactériens et ne se présente pas sous forme de filaments. L'image observée ressemble un peu à une capsule, d'où le nom donné aux gènes, *clp* pour « capsule like protein » (Fig. 6).

### 3.3. Déterminisme génétique.

Ces deux antigènes sont codés chacun par un opéron, figure 7 :

- l'opéron *foo* codant pour F165<sub>1</sub> comprend 10 gènes, il est chromosomique (Maiti *et al.*, 1994).
- l'opéron *clp* codant pour CS31A comprend 9 gènes, il est plasmidique (Martin, 1996).



**Fig. 7 :** Organisation génétique des opérons *foo* et *clp*. Dans la région promotrice de chaque opéron se trouvent deux sites GATC. En amont du promoteur de l'opéron *foo* se trouve le gène *fooI* codant pour le régulateur transcriptionnel FooI.

Les gènes B (*clpB*, *fooB*) codent pour des régulateurs transcriptionnels homologues de PapB, régulateur transcriptionnel de l'opéron *pap*. Les gènes *clpG* et *fooA* codent pour les sous unités majeures des fimbriae, les gènes *clpFHIJ* et *fooHJKEF* codent pour les sous unités structurales mineures, le gène *fooG* pour l'adhésine G, les gènes *clpD* et *fooC* pour la protéine d'ancrage, les gènes *clpE* et *fooD* pour la protéine chaperon périplasmique (Bertin *et al.*, 1993; Harel *et al.*, 1992b; Maiti *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1991). En amont du promoteur de chaque opéron, se trouvent deux motifs nucléotidiques GATC séparés de 102 pb (*foo*) ou 103 pb (*clp*), impliqués dans la régulation de l'expression de l'opéron (Fig. 7). En amont de la région promotrice de *foo*, et orienté de façon divergente à l'opéron *foo*, se trouve le gène *fooI* avec son propre promoteur. Ce gène code pour un régulateur transcriptionnel de *foo*, homologue de PapI. En amont de *clp* se trouve une *IS600*, il n'y a pas de gène équivalent à *fooI*.

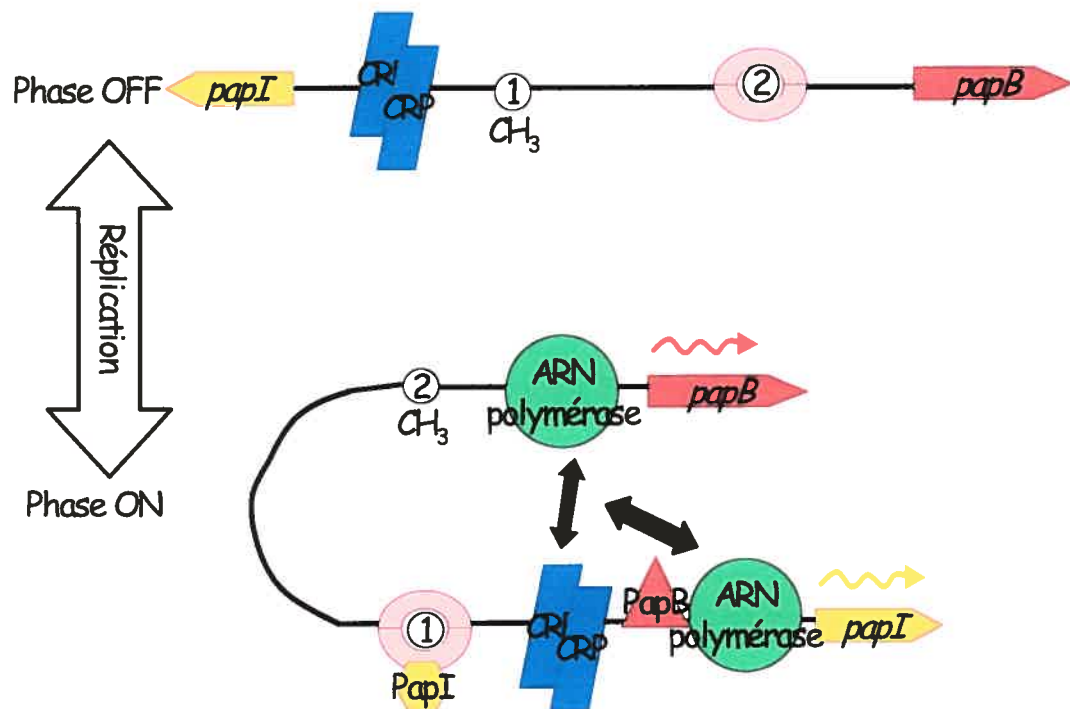
### 3.4. Régulation de la synthèse de CS31A et F165<sub>1</sub>.

#### 3.4.1. La variation de phase et le taux de transcription.

Comme d'autres fimbriae (Pap, type I,...) les fimbriae F165<sub>1</sub> et CS31A sont soumis à deux types de régulation (Harel et Martin, 1999; Low *et al.*, 1996) :

- le premier contrôle le taux de synthèse des fimbriae à la surface des micro-organismes.
- le second contrôle le pourcentage de bactéries, dans la population bactérienne, qui synthétisent le fimbriae. C'est le phénomène de variation de phase.

Ces deux types de régulation peuvent contrôler simultanément la synthèse d'un fimbriae et s'exercent au niveau transcriptionnel (Blomfield, 2001).



**Fig. 8** : Schéma de la variation de phase de l'opéron *pap*, sous le contrôle par la méthylation des sites GATC tel que proposé par Herdnay *et al.*, 2002.

Les sites GATC sont indiqués par les ronds 1 et 2. Sont dessinés, en rose, un dimère de Lrp; en bleu, un dimère de CRP; en rouge, l'opéron *pap*; en jaune, le gène *papI*. Les produits

des gènes sont représentés de la même couleur que leur gène. Les ronds verts représentent l'ARN polymérase. En phase OFF Lrp lie le site GATC 2 et le site GATC 1 est méthylé. La fixation de l'activateur CRP ne permet pas la transcription de *pap*, car Lrp bloque l'accès de l'ARN polymérase au promoteur. Pour passer en phase ON, il faut attendre la réplication de l'ADN, pour avoir la synthèse d'un nouveau brin non-méthylé, accessible à Lrp et Dam. On peut obtenir alors le profil suivant, le site GATC 2 est méthylé alors que le site GATC 1 est occupé par le dimère de Lrp complexé à PapI.

### 3.4.2. Les données de la régulation transcriptionnelle de *clp* et *foo*.

La régulation transcriptionnelle de *foo* et de *clp* fait intervenir plusieurs régulateurs :

- des régulateurs spécifiques du système considéré, tels que les protéines homologues de PapB ou de PapI : FooB (Daigle *et al.*, 2000) et ClpB (Martin, 1996) codées par le gène B de chaque opéron, FooI (Harel *et al.*, 2000) Tessier *et al.* en préparation) étant un régulateur de la variation de phase. Un gène codant pour l'homologue de PapI n'a pas été identifié à proximité de l'opéron *clp*. Les observations de la souche sauvage 31A en microscopie électronique en immunofluorescence, ont montré que dans une même population, certaines bactéries produisaient CS31A et d'autres ne le produisaient pas. CS31A est donc soumis au contrôle de la variation de phase. De plus, il a été démontré que dans un clone comportant seulement l'opéron *clp* et sa région promotrice il n'y a plus de variation de phase (Martin, 1996). Comme la régulation de l'expression de l'opéron *clp* nécessite Lrp, Dam, deux sites GATC, ClpB, cette régulation est sur le même modèle que le contrôle de l'opéron *pap* (voir chapitre 3.4.3). Donc il semble vraisemblable que la variation de phase de *clp* nécessite un homologue de PapI. Deux hypothèses sont possibles : soit le gène homologue de *papI* est séparé de l'opéron *clp* par des IS (comme dans K88, (Huisman *et al.*, 1994), soit il n'existe pas et il y a une régulation croisée avec un gène spécifique d'un autre opéron fimbriaire présent sur le chromosome. En effet, il a déjà été montré une complémentarité fonctionnelle entre les gènes régulateurs de différents

systèmes. Par exemple, PefI de *S. typhimurium* active la transcription de *papBA* chez *E. coli* alors qu'il réprime l'expression de *pef* (Nicholson et Low, 2000), et PapI, qui active l'expression de *pap*, réprime la transcription de l'opéron *fae* (codant pour K88) comme le fait son homologue FaeA (Huisman *et al.*, 1994).

- des régulateurs globaux du métabolisme cellulaire, tels que Lrp, CRP. La protéine Lrp se fixe au niveau de six sites spécifiques sur l'ADN double brin de la région régulatrice de l'opéron *pap*. Parmi ces sites se trouve deux sites GATC séparés de 102 pb. Les régions régulatrices des opérons *foo* et *clp* possèdent elles aussi deux sites GATC séparés de 102 et 103 pb respectivement (Daigle *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2000; Martin, 1996). La protéine Dam méthyle les adénosines des sites GATC. Lrp ne se fixe pas sur un site GATC méthylé. Lorsque Lrp est fixé sur un site GATC, elle le protège de la méthylation (Braaten *et al.*, 1991; Martin, 1996). Le régulateur CRP (cAMP Receptor Protein) est impliqué dans le processus de répression catabolique par le glucose de l'opéron *foo* (Daigle *et al.*, 2000).

La comparaison des caractéristiques de la régulation transcriptionnelle de *foo* et *clp* avec celles des autres opérons codant pour des fimbriae nous indique que la régulation de l'expression de l'opéron *pap* est la plus proche. Les opérons *pap-17*, *pap-21* et *pap-F13* sont presque identiques. La fixation de PapB à la région régulatrice de l'opéron *pap* a été étudiée chez *pap-F13*, alors que la fixation de Lrp, CRP et PapI à leurs cibles nucléotidiques respectives a été décrite chez *pap-17*. Les fines différences nucléotidiques entre ces trois systèmes génétiques peuvent avoir un rôle fonctionnel lors des interactions ADN-protéines. C'est pourquoi la comparaison des séquences peptidiques de FooB, ClpB et FooI avec celles de leurs homologues respectifs dans les trois opérons *pap*, ainsi que la comparaison des régions régulatrices de chaque opéron sont importantes (Fig. 8).



**A**

PapB-F13	MAHHEVISRSGNAFLLNIRESVLLPGSMSEMHFFLLIGISSIHSDRVILAMKDYLVG	57
PapB-17	MAHHEVISRSGNAFLLNIRESVLLPGSMSEMHFFLLIGISSIHSDRVILAMKDYLVG	57
PapB-21	GGNMAHHEVISRSGNAFLLNIRESVLLPGSMSEMHFFLLIGISSIHSDRVILAMKDYLVG	60
FooB	MAHHEVISQSGNVFLLNIRESVLLPGSMSEMHFFLLIGISSIHSDRVILAMKDYLVG	57
ClpB	MS-SSNL <del>YL</del> SKKHGR <del>TL</del> SPGKMSESQFWLLAEISPVHSEKVLNALRDFLVL	50

PapB-F13	GHSRKEVCEKYQMNNGYFSTTLGRLIRLNALAARLAPYYTDESSAFD--	104
PapB-17	GHSRKEVCEKYQMNNGYFSTTLGRLIRLNALAARLAPYYTDESSAFD--	104
PapB-21	GHSRKEVCEKYQMNNGYFSTTLGRLIRLNALAARLAPYYTDESSA----	105
FooB	GHSRKEVCEKYQMNNGYFSTTLGRLIRLNALAARLAPYYTDESSAFD--	104
ClpB	GYTRREACERHEVSQGYFSGALGRIQ <del>TH</del> QAVNRLVPFYISEAGIPYTG	99

---

PapI-F13	MSEYMKNEILEFLNRHNGGKTAEIAEALAVTDYQARYYLL <del>LE</del> KEGMVQRSP	52
PapI-17	MSEYMKNEILEFLNRHDGGKTAEIAEALAVTDYQARYYLL <del>LE</del> KEGMVQRSP	52
PapI-21	MSEYMKNEILEFLNRHNGGKTAEIAEALAVTDYQARYYLL <del>LE</del> KEGMVQRSP	52
FooI	MSEYMKNEILEFLNRHNGGKTAEIAEALAVTDYQARYYLL <del>LE</del> KEGMVQRSP	52

PapI-F13	LRRGMATYWFLKGE <del>MQ</del> AGQNCSTT-	77
PapI-17	LRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSTT-	77
PapI-21	LRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSTT-	77
FooI	LRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSTT-	77

**Fig. 9:** Comparaison par alignement des séquences peptidiques des protéines régulatrices et des séquences nucléotidiques des régions régulatrices des opérons *pap*, *foo* et *clp*.

Alignements réalisés à l'aide du logiciel CLUSTAL W (1.82). (A) Comparaison des séquences peptidiques des protéines régulatrices. En caractères gras sont indiqués les résidus différents; en vert, les résidus aminés hydrophobes; en bleu, les résidus polaires non hydrophobes; en noir, le groupe amide non hydrophobe non polaire; en rouge, les résidus aliphatiques non hydrophobes non polaires. (B) Comparaison des séquences nucléotidiques des régions régulatrices. Les nucléotides différents sont indiqués en caractères rouge et vert. Les deux sites GATC sont encadrés en bleu. Deux des trois sites de fixation de PapB sur la région régulatrice de *pap*-F13 sont surlignés en jaune. La séquence similaire au consensus de CRP est surlignée en vert. Les six sites de fixation de Lrp sur la région régulatrice de *pap*-17 sont surlignés en bleu.

**B**

```

pap-F13 CTCACGTAAACAAAGTTTCTTCGAATAATAAAAAATCATGCTTTCTGTTATCAACGGAAAG 60
pap-17 CTCACGTAAACAAAGTTTCTTCGAATAATAAAAAATCATGCTCTCTGTTATCAACGGAAAG 60
pap-21 CTCACGTAAACAAAGTTTCTTCGAATAATAAAAAATCATGCTTTCTGTTATCAACGGAAAG 60
foo CTCACGTAAACAAAGTTTCTTCGAATAATAAAAAATCATGCTCTCTGTTATCAACGGAAAG 60
clp -----GTTCTACTAAT--TGGATGCGCTACCGTTTTTGACTCTCCCTGT 43

pap-F13 GTATTTTATTCTCTGTGTTTGCT-----TTATTTGTGAAATT-TAGTGAATTTGC 110
pap-17 GTATTTTATTCTCTCTATGTTTGCT-----TTATTTGTTC AATT-TAGTGAATTTGC 110
pap-21 GTATTTTATTCTCTGTGTTTGCTGTGTTTGCTTTATTTGTTC AATT-TAGTGAATTTGC 119
foo GTATTTTATTCTCTGTATTTTGCT-----TTATTTGCGAAATT-TAGTGAATTTGC 110
clp TTGATTTTCTGCTTTAATAATTTT-----TTAACTTTAAATTCATATTTTATATGA 94

pap-F13 TTTTGTGTTGGCTTTATTTGATGTGTGTCACATTTTGTTGTTAT-TTTCTGTGAAAGA 169
pap-17 TTTTATTTGGATTTATTTGATGTGTATCACATTTTGCCTTTTAT-TTTCTGTGAAAGA 169
pap-21 TTTTATTTGGCTTTATTTGATATGTATCACATTTTGCCTTTTAT-TTTCTGTGAAAGA 178
foo TTTTGTGTTGGCTTTATTTGATGTGTGTCACATTTTGTTGTTAT-TTTATGTGAAAGA 169
clp AAAGTGTGACATTTTTTTGTGATGAAATCTAAATTAACGCAAAAACCTTATCTGGAATGC 154

site 4 site 5 site 6
pap-F13 AAGTCCGTAAAAATGCATTTAGACGATCTTTTATGCTGTAAATTCAAT-TCACCATGATG 228
pap-17 AAGTCCGTAAAAATGCATTTAGACGATCTTTTATGCTGTAAATTCAAT-TTCCATGATG 228
pap-21 AAGTCCGTAAAAATGCATTTAGACGATCTTTTATGCTGTAAATTCAAT-TTACATGATG 237
foo AAGTCCGTAAAAATGCATTTAGACGATCTTTTATGCTGTAAATTCAAT-TCACCATGATG 228
clp AATTTTGATTTTGTGTTTATGACGATCTTTTATCTGTGATTTTGTGTTTGTGTTGTTG 214

site 1
pap-F13 TTTTATCTGAGTGCATTCTTTTGTGTTGTTGTTTATTCTAGTTTGAT-TTTGTTTTT-GT 286
pap-17 TTTTATCTGAGTACCTCTTGTCTTTATGTTGTTTATTCTAGTTTAAAT-TTTGTTTTT-GT 286
pap-21 TTTTATCTGAGTGCATTCTTTATTATTAGTGTGTTTATTCTAGTTTAAAT-TTTGTTTTT-GT 295
foo TTTTATCTGAGTGCATTCTTGTGTTGTTGTTGTTTATTCTAGTTTGAT-TTTGTTTTT-GT 286
clp GCTTTTCTG--TGTGTTGTTGTTTGTGTTTATTGTTGTTGATGTTGTTTTTGT 272

site 2 site 3
pap-F13 GGGTTAAAGATCGTTTAAATCAATATTTACAACATAAAAAACTAAATTTAACTTATTGC 346
pap-17 GGGTTAAAGATCGTTTAAATCAATATTTACAACATAAAAAACTAAATTTAACTTATTGC 346
pap-21 GGGTTAAAGATCGTTTAAATCAATATTTACAACATAAAAAACTAAATTTAACTTATTGC 355
foo AGGTTAAAGATCGTTTAAATTAATATTTACAACATAAAAAACTAAATTTAACTTATTGC 346
clp AGTTGTAAGATCGTT-AAATAGTGTTTTCGCTATAAAACATCGTGATAATCTTCGCT 331

pap-F13 GTGAAGAGTATTTCCGGGCCGGAA-GCATATATCCAGGGGCCCGACAGAAGGGGGAAAC- 404
pap-17 GTGAAGAGTATTTCCGGGCCGGAA-GCATATATCCAGGGGCCCGACAGAAGGGGGAAAC- 404
pap-21 ATGAAGAGTATTTCCGGGCCGGAA-GCATATATCCAGGGGCCCGACAGAA----- 404
foo GTGAAGAGTATTTCCGGGCCGGAA-GCATATATCCAGGGGCCCGACAGAAGGGGGAAAC- 404
clp GCAGAAACAGGACGGCAACAGAGTGAATACGTTTTGTTATCGGGGTATGTCGCTTTT 391

pap-F13 -----
pap-17 -----
pap-21 -----
foo -----
clp TGGTCTGTTATATTTCTGGAATGGATATAA 422

```

La comparaison détaillée des protéines régulatrices B et I se trouve dans les paragraphes 4.1.1 et 4.1.2. En résumé, les séquences peptidiques des protéines PapB-17, PapB-21, PapB-F13 et FooB sont très similaires alors qu'elles diffèrent de celle de ClpB. La séquence peptidique de FooI est identique à celle de PapI-21 et ne diffère que d'un acide aminé de celle de PapI-17 et de deux résidus de celle de PapI-F13. La comparaison des séquences des régions régulatrices des cinq opérons montre que tous présentent deux sites GATC séparés de 102 (*pap*-17, *pap*-21, *pap*-F13, *foo*) ou 103 pb (*clp*). Les six sites de fixation de Lrp, les deux sites de fixation de PapB et la séquence similaire au consensus de CRP sont conservés chez *foo* mais pas chez *clp*.

La régulation transcriptionnelle de l'opéron *pap* a été largement étudiée et a permis d'élucider le mécanisme de variation de phase contrôlant cet opéron (Herdnay *et al.*, 2002). Le chapitre 3.4.3. décrit ce mécanisme. Le mécanisme de régulation transcriptionnelle des opérons *foo* et *clp* s'apparenterait avec celui établi pour le pili Pap du fait :

- de fortes homologies nucléotidiques entre les régions régulatrices de *pap* et *foo* et de la présence de deux sites GATC séparés de 102 bp chez *pap* et *foo* et de 103 bp chez *clp*, les sites GATC étant impliqués dans le mécanisme de variation de phase de l'opéron *pap*, décrit au chapitre 3.4.3 (Herdnay *et al.*, 2002).
- des homologies protéiques entre les régulateurs FooI-PapI, ClpB-FooB-PapB (Harel *et al.*, 2000; Martin, 1996).
- de l'implication du régulateur Lrp dans le contrôle transcriptionnel des opérons *pap*, *foo* et *clp* (Daigle *et al.*, 2000; Martin, 1996).

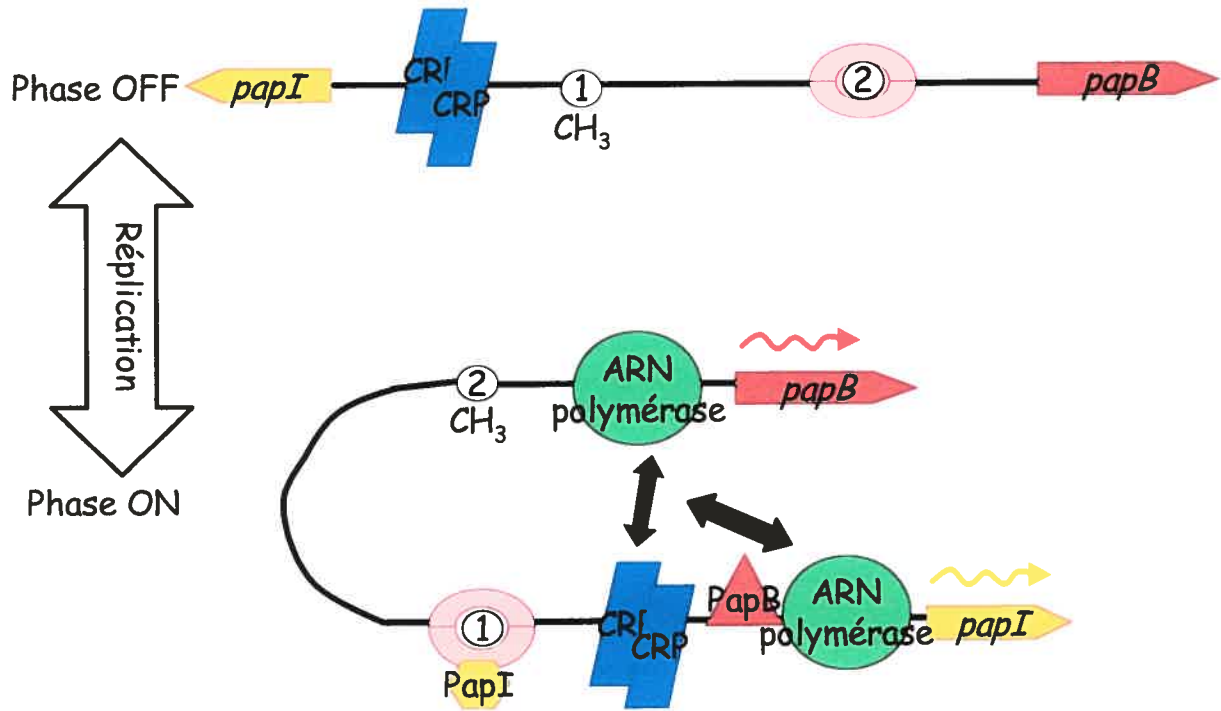
Toutefois il existe des différences entre ces trois opérons. La proportion de cellule en phase ON et OFF est nettement différente entre les cellules contenant l'opéron *pap* ou l'opéron *foo*. Lrp est un activateur transcriptionnel de *pap* et *foo* mais un répresseur transcriptionnel de *clp*. Contrairement à l'opéron *pap*, l'expression de *foo* et *clp* est réprimée par l'alanine et la leucine. Donc il serait intéressant de caractériser les mécanismes de régulation transcriptionnelle de *foo* et de *clp* pour comprendre ces différences fonctionnelles.

### 3.4.3. La variation de phase de l'opéron *pap*.

La région promotrice de l'opéron *pap* contient deux motifs nucléotidiques GATC séparés par 102 pb, qui sont compris dans les six sites de liaison du régulateur Lrp (Båga *et al.*, 1985; Nou *et al.*, 1995). Ces six sites sont séparés les uns des autres par environ trois tours d'hélice. Les sites de liaison 1, 2 et 3 se trouvent autour du site GATC-2, tandis que les sites 4, 5 et 6 entourent le site GATC-1. Les sites GATC-1 et GATC-2 sont localisés, respectivement, à l'intérieur des sites 2 et 5. Lrp fixe de façon coopérative d'une part les sites 1, 2 et 3 ; et d'autre part les sites 4, 5 et 6 (Fig. 8) (Nou *et al.*, 1995).

La liaison de Lrp à l'ADN dépend de la méthylation différentielle des deux sites GATC par Dam, (Fig. 9) : la liaison de Lrp près d'un site GATC empêche Dam de le méthylé, et la méthylation d'un site GATC sur les deux brins d'ADN par Dam, empêche Lrp de s'y fixer (Blyn *et al.*, 1990; Braaten *et al.*, 1992; Braaten *et al.*, 1994; Nou *et al.*, 1993; van der Woude *et al.*, 1998; van der Woude *et al.*, 1992). En phase OFF, les dimères de Lrp se fixent préférentiellement au niveau du site GATC-2 tandis que GATC-1 est méthylé et la transcription est bloquée (Braaten *et al.*, 1994; Nou *et al.*, 1995; Weyand et Low, 2000). Lorsque la réplication de l'ADN a lieu, il y a synthèse d'un nouveau brin d'ADN qui n'est pas encore méthylé. Lrp peut fixer un site GATC hémi-méthylé (Nou *et al.*, 1993). Une compétition pour les deux sites GATC entre Lrp et Dam s'instaure, et un changement du profil de méthylation peut apparaître. En phase ON, les dimères de Lrp complexés à PapI se fixent préférentiellement au site GATC-1 (Nou *et al.*, 1993), car, PapI modifie l'affinité de Lrp pour ses cibles en faveur des sites entourant GATC-1 (Kaltenbach *et al.*, 1995; Nou *et al.*, 1995; Braaten *et al.*, 1994). Sans PapI, il n'y a jamais fixation de Lrp au niveau du site GATC1 *in vivo* (Blyn *et al.*, 1990; Nou *et al.*, 1995). De plus, PapI ne se fixe à Lrp que lorsque Lrp est fixé à l'ADN. Des études sont en cours dans le laboratoire du Dr D. Low pour déterminer si PapI se fixe aussi sur l'ADN (Herdnay *et al.*, 2002). Le site GATC-2 libre est méthylé par Dam. Cette méthylation est indispensable pour permettre l'activation du promoteur de *pap* (Blyn *et al.*, 1990). Pour activer la transcription de l'opéron, les interventions du régulateur PapB et de CRP sont nécessaires (Båga *et al.*, 1985; Blyn *et al.*, 1989; Göransson *et al.*, 1989a; Weyand *et al.*, 2001; Xia et Uhlin, 1999). Un certain nombre de bactéries d'une population présentent les deux sites GATC méthylés. Dans ce profil de méthylation, l'opéron *pap* n'est pas transcrit (Blyn *et al.*, 1990).

Ainsi, Lrp peut agir aussi bien en tant que répresseur et qu'activateur de la transcription de l'opéron *pap*, selon que Lrp occupe les sites de liaison à l'ADN dans la région GATC-2 ou dans la région GATC-1, respectivement (Blyn *et al.*, 1989; Blyn *et al.*, 1990; Herdnay *et al.*, 2002; van der Woude *et al.*, 1998; van der Woude *et al.*, 1995).





**Fig. 10** : Schéma de la variation de phase de l'opéron *pap*, sous le contrôle par la méthylation des sites GATC tel que proposé par Herdnay *et al.*, 2002. Les sites GATC sont indiqués par les ronds 1 et 2. Sont dessinés, en rose, un dimère de Lrp; en bleu, un dimère de CRP; en rouge, l'opéron *pap*; en jaune, le gène *papI*. Les produits des gènes sont représentés de la même couleur que leur gène. Les ronds verts représentent l'ARN polymérase. En phase OFF Lrp lie le site GATC 2 et le site GATC 1 est méthylé. La fixation de l'activateur CRP ne permet pas la transcription de *pap*, car Lrp bloque l'accès de l'ARN polymérase au promoteur. Pour passer en phase ON, il faut attendre la réplication de l'ADN, pour avoir la synthèse d'un nouveau brin non-méthylé, accessible à Lrp et Dam. On peut obtenir alors le profil suivant, le site GATC 2 est méthylé alors que le site GATC 1 est occupé par le dimère de Lrp complexé à *PapI*.

#### 3.4.4. Effet des conditions environnementales sur l'expression de *foo* et *clp*.

Les signaux environnementaux qui influent sur la synthèse de ces adhésines sont encore mal connus. La L-leucine et la L-alanine inhibent fortement la production de F165<sub>1</sub> et CS31A en réprimant la transcription de base des opérons codant pour ces antigènes (Daigle *et al.*, 1997; Harel *et al.*, 2000; Martin, 1996). En présence de glucose ou dans un milieu riche l'expression des deux opérons est aussi réprimée. C'est en milieu pauvre qu'on observe le meilleur taux de transcription. La température a elle aussi un effet sur l'activité des promoteurs de *foo* et *clp*, leur activité étant réprimée à 18°C et maximale à 37°C (Daigle *et al.*, 1997; Daigle *et al.*, 2000; Girardeau *et al.*, 1988; Harel *et al.*, 2000; Martin, 1996).

Si l'on compare la régulation de l'expression des opérons *clp* et *foo* avec celle d'autres opérons fimbriaires, F165<sub>1</sub> étant un homologue du pili Pap et CS31A étant un homologue de K88, on remarque que, (Tableau 3) :

- F165<sub>1</sub>, le Pili Pap et CS31A sont soumis à la variation de phase alors que K88 ne l'est pas (Blyn *et al.*, 1989; Daigle *et al.*, 1997; Huisman *et al.*, 1994; Martin, 1996).
- la présence dans le milieu de culture de L-alanine ou de L-leucine modifie l'expression de *foo* et *clp* alors que ces régulations n'existent pas chez leurs homologues (Harel *et al.*, 2000; Martin, 1996)
- le régulateur Lrp exerce une action opposée pour *clp* et *foo*. Lrp active la transcription des opérons *foo*, *pap* et réprime l'expression des opérons *clp* et *fae* (codant pour K88) (Braaten *et al.*, 1992; Daigle *et al.*, 2000; Huisman *et al.*, 1994; Martin, 1996).

Opéron, Fimbriae	Variation de phase	Effet de L-alanine ou de L-leucine	souche Lrp-
<i>pap</i> , pili Pap F7-16	Oui	Non	OFF
<i>fae</i> , F4 (K88)	Non	Non	
<i>fan</i> , F5 (K99)	Non	Oui	
<i>foo</i> , F165 <sub>1</sub>	Oui	Oui	OFF
<i>clp</i> , CS31A	Oui	Oui	ON

**Tableau 3:** Comparaison de la régulation transcriptionnelle des opérons *pap*, *fae*, *fan*, *foo* et *clp*. Les facteurs d'adhésion K88 et CS31A sont homologues, Pap et F165<sub>1</sub> font partie de la même famille. Le contrôle de la variation de phase ne s'exerce pas sur tous les opérons, ni la répression par l'alanine et la leucine. La modification du phénotype de la variation de phase ou de la transcription dans une souche Lrp négative par rapport à une souche sauvage est indiquée.

### 3.5. Conclusions.

La régulation transcriptionnelle des opérons *clp* et *foo* présente plusieurs similitudes, telles que les protéines régulatrices Lrp, Dam, les homologues de PapI et PapB, les motifs GATC conservés dans les régions régulatrices, et l'effet répresseur de la leucine et de l'alanine. Cela suggère que les opérons *foo* et *clp* soient soumis à un mécanisme de régulation semblable à celui gouvernant la transcription de l'opéron *pap*. Toutefois, ces deux opérons ont la particularité d'être réprimés par la présence de L-leucine ou de L-alanine dans le milieu environnant. L'action de Lrp sur les deux opérons est différente, et le mécanisme moléculaire par lequel les acides aminés agissent sur la transcription des gènes est très mal connu. Il est important de comprendre ce mécanisme pour comprendre comment des facteurs présents dans l'environnement immédiat du pathogène peuvent

réguler la synthèse de facteurs de virulence. En effet, ces systèmes de régulation deviennent des cibles intéressantes pour développer des drogues anti-infectieuses en alternative à l'utilisation d'antibiotiques.

#### **4. LES REGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS DES OPERONS *foo* ET *clp* ET LEUR IMPLICATION DANS LA REPONSE AUX STIMULI ENVIRONNEMENTAUX.**

Ce chapitre présente les différents régulateurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'opéron *pap* et qui seraient eux même ou leurs homologues impliqués dans la régulation transcriptionnelle des opérons *clp* et *foo*. Pour chaque régulateur la relation avec un stimulus environnemental est mise en évidence s'il y a lieu. Les stimuli environnementaux affectant la transcription de l'opéron *pap* dont on ne connaît pas le mécanisme moléculaire ne sont pas traités.

##### **4.1. Les protéines de régulation PapB et PapI.**

###### **4.1.1. PapB et ses homologues.**

Les protéines FooB et ClpB sont homologues à PapB. FooB diffère de PapB-17 et de PapB-F13 par trois résidus aminés situés à l'extrémité N-terminale en positions 9 (arginine/glutamine), et 13 (alanine/valine), et présente les mêmes changements envers PapB-21 sauf que les positions sont 12 (arginine/glutamine) et 16 (alanine/valine) car PapB-21 a trois résidus aminés supplémentaires à l'extrémité amino-terminale. De plus il manque les deux derniers acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale chez cette protéine (Fig. 10) (Daigle *et al.*, 2000). ClpB présente 41 % d'identité protéique avec PapB-17 (Martin, 1996). PapB s'oligomériser via les acides aminés des positions 35-36, 53-56, 74-76 et lie l'ADN au niveau de trois sites nucléotidiques, le premier site est situé en amont de *papI*, le deuxième en amont de l'opéron *pap* et le troisième est situé dans le gène *papB*. Les résidus aminés 61 et 65 de PapB interagissent avec l'ADN (Xia *et al.*, 1998).



PapB-F13	MAHHEVISRSGNAFLLNIRESVLLPGSMSEMHHFLLIGISSIHSDRVILAMKDYLVG	57
PapB-17	MAHHEVISRSGNAFLLNIRESVLLPGSMSEMHHFLLIGISSIHSDRVILAMKDYLVG	57
PapB-21	GGNMAHHEVISRSGNAFLLNIRESVLLPGSMSEMHHFLLIGISSIHSDRVILAMKDYLVG	60
FooB	MAHHEVISQSGNVFLLNIRESVLLPGSMSEMHHFLLIGISSIHSDRVILAMKDYLVG	57
ClpB	MS--SNLYLSKKHGRTLSPGKMSESQFWLLAEISPVHSEKVLNALDFLVL	50
PapB-F13	GHSEKEVCEKYQMNGYFSTTLGRLIRLNALAARLAPYYTDESSAFD--	104
PapB-17	GHSEKEVCEKYQMNGYFSTTLGRLIRLNALAARLAPYYTDESSAFD--	104
PapB-21	GHSEKEVCEKYQMNGYFSTTLGRLIRLNALAARLAPYYTDESSA----	105
FooB	GHSEKEVCEKYQMNGYFSTTLGRLIRLNALAARLAPYYTDESSAFD--	104
ClpB	GYTEEAACERHEVSQGYESGALGRIQRTHQAVNRLVPFYISEAGIPYTG	99

**Fig. 11:** Comparaison des protéines régulatrices B des opérons *pap*, *foo* et *clp*. Alignements réalisés à l'aide du logiciel CLUSTAL W (1.82). FooB présente respectivement 98%, 99% et 97% d'identité avec PapB-F13, PapB-17 et PapB-21. ClpB présente respectivement 38%, 40% et 41% d'identité avec PapB-F13, PapB-17 et PapB-21. Sont indiqués en caractères rouges, les résidus différents; en jaune, les résidus aminés impliqués dans l'oligomérisation de PapB-F13; en bleu, les résidus aminés impliqués dans la fixation à l'ADN. D'après Xia *et al.*, 1998.

PapB, à faible concentration, active la transcription de *papI* et par conséquent celle de *pap*, alors qu'à forte concentration cette protéine réprime la transcription de *pap* (Blyn *et al.*, 1989; Göransson *et al.*, 1989b; Xia *et al.*, 1998). Il existe de nombreux homologues de PapB et une étude a démontré que PrfB et SfaB sont des homologues fonctionnellement interchangeables entre eux, alors que FanA et FanB ne sont pas interchangeables avec PapB (Holden *et al.*, 2001; Morschhäuser *et al.*, 1994).

#### 4.1.2. PapI et ses homologues.

La protéine régulatrice FooI est identique à PapI-21 à l'exception d'un acide aminé qui diffère de PapI-17 (asparagine/aspartate en position 17) et de trois résidus de PapI-F13 (alanine/glutamate en position 45, lysine/méthionine en position 67, sérine/asparagine en

position 72) (Fig. 11) (Daigle *et al.*, 2000). Jusqu'à présent, aucun homologue de FooI et PapI n'a été identifié chez l'opéron *clp*, bien que la variation de phase de *clp* soit démontrée dans la souche sauvage 31A et qu'elle nécessite un homologue de PapI (Martin, 1996). PapI active la transcription de *pap* (Båga *et al.*, 1985). En se complexant au régulateur Lrp, PapI diminue l'affinité de Lrp pour la région couvrant le site GATC-2 et augmente l'affinité de Lrp pour la région couvrant le site GATC-1. Le complexe PapI-Lrp se déplace alors du site répresseur GATC-2 vers le site activateur GATC-1, si celui-ci n'est pas méthylé sur les deux brins et la transcription de *pap* peut s'effectuer (Kaltenbach *et al.*, 1995; Nou *et al.*, 1993; Nou *et al.*, 1995; van der Woude *et al.*, 1995). Les résidus aminés responsables de l'interaction PapI-Lrp ne sont pas encore connus.

PapI-F13	MSEYMKNEILEFLNRHNGGKTAEIAEALAVTDYQARYYLLLEKEGMVQRSP	52
PapI-17	MSEYMKNEILEFLNRHDGGKTAEIAEALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSP	52
PapI-21	MSEYMKNEILEFLNRHNGGKTAEIAEALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSP	52
FooI	MSEYMKNEILEFLNRHNGGKTAEIAEALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSP	52
PapI-F13	LRRGMATYWFLKGEMQAGQNCSTT-	77
PapI-17	LRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSTT-	77
PapI-21	LRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSTT-	77
FooI	LRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSTT-	77

**Fig. 12:** Comparaison des protéines régulatrices I des opérons *pap* et *foo*. Les alignements ont été réalisés à l'aide du logiciel CLUSTAL W (1.82). FooI présente respectivement 96%, 99% et 100% d'identité avec PapI-F13, PapI-17 et PapI-21. En caractères gras, sont indiqués les résidus différents.

Il a été démontré que des complémentations fonctionnelles étaient possibles entre les homologues de PapI. Ainsi, PefI active tout comme PapI la transcription de *pap* chez *E.coli* alors qu'il réprime la transcription de *pef* chez *S.typhimurium* (Nicholson et Low, 2000). De plus, PapI réprime la transcription de l'opéron *fae* (codant pour K88) tout comme son homologue FaeA régulateur spécifique de *fae* (Huisman *et al.*, 1994). AfaF, un autre homologue de PapI, permet la variation de phase de *clp* en l'absence du véritable régulateur

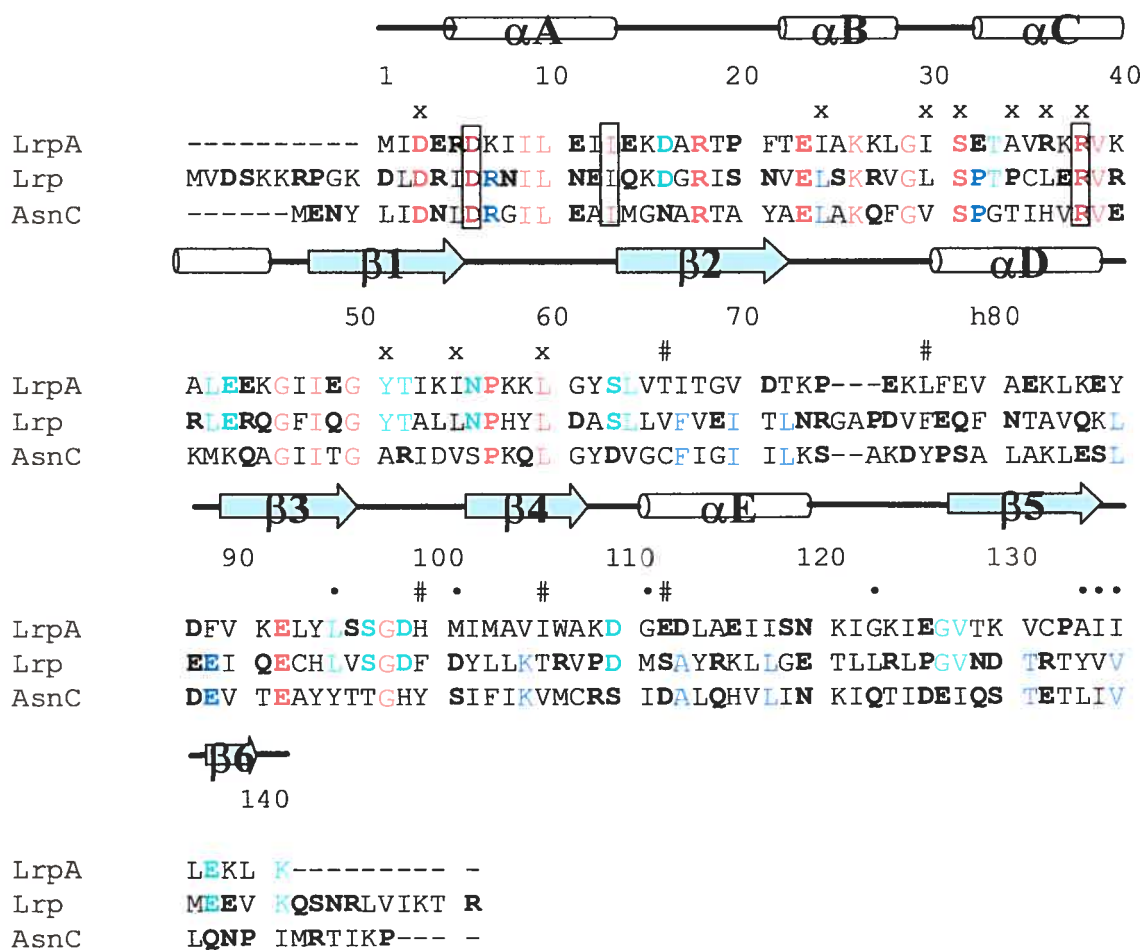
impliqué dans la régulation transcriptionnelle de *clp* (Martin, 1996). SfaC et DaaF, contrôlant la production des fimbriae S et F1845, sont aussi des homologues fonctionnels de PapI (Göransson *et al.*, 1988; van der Woude et Low, 1994).

## **4.2. Les régulateurs globaux.**

### **4.2.1. LRP, Leucine responsive regulatory protein.**

#### **4.2.1.1. Généralités sur Lrp.**

Lrp (*Leucine-Responsive Regulatory Protein*) est une petite protéine basique (pI 9,2) de 18,8 kDa, qui se lie à l'ADN sous forme de dimère (Calvo et Matthews, 1994; Newman et Lin, 1995). La quantité de dimères de Lrp a été estimée par immuno-détection. Une cellule d' *E.coli* produit 3000 dimères de Lrp lorsqu'elle est cultivée en milieu pauvre à 37°C alors qu' en milieu riche, seulement 1200 dimères sont produits en phase exponentielle de croissance et 120 dimères en phase stationnaire (Azam et Ishihama, 1999; Willins *et al.*, 1991). Cette protéine, du fait de ses homologies peptidiques (25% d'identité avec AsnC de *E. coli*) et fonctionnelles, fait partie de la famille des protéines régulatrices AsnC (Fig. 12) (Willins *et al.*, 1991). AsnC est responsable de la régulation transcriptionnelle de *asnA* (codant pour l'asparagine synthétase A) et *asnC*. AsnC active la transcription de *asnA*, et l'asparagine antagonise l'action de AsnC sur ce gène, alors que AsnC s'autoréprime indépendamment de l'asparagine (de Wind *et al.*, 1985; Kolling et Lother, 1985).



**Fig. 13:** Alignement des séquences peptidiques de LrpA de *P. furiosus*, Lrp de *E. coli* et AsnC de *E. coli*. Localisation des mutations de Lrp, dans le domaine de liaison à l'ADN, le domaine d'activation et le domaine de réponse à la leucine, réalisées par Calvo et Platko en 1993. Les éléments de structure secondaire sont montrés au-dessus de la séquence de LrpA. Les cylindres représentent les hélices- $\alpha$  et les flèches représentent les feuillets- $\beta$ . Les résidus qui sont conservés chez les trois protéines sont en rouge. Les résidus qui sont conservés seulement parmi Lrp et AsnC sont en bleu, alors que ceux seulement conservés chez LrpA et Lrp sont en vert. Les résidus non hydrophobes sont en caractères gras. La position des mutations du domaine de liaison à l'ADN, du domaine d'activation de Lrp et du domaine de réponse à la leucine est indiquée par les symboles x, # et •, respectivement. D'après Leonard *et al.*, 2001.

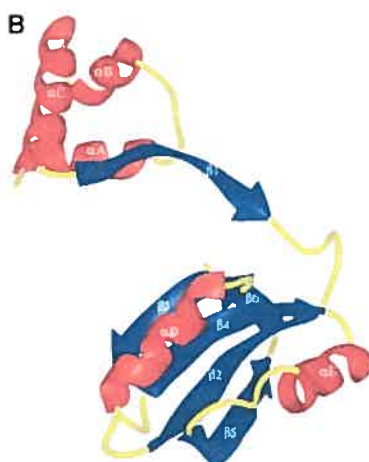
Lrp gouverne l'expression de nombreux gènes et opérons chez les bactéries, on parle du "régulon Lrp" (Calvo et Matthews, 1994; Ernsting *et al.*, 1992; Newman et Lin, 1995). On découvre de nouveaux homologues de Lrp parmi les bactéries entériques et les archaebactéries. Une liste récente a été dressée et analysée par Friedberg et coll : sur 824 comparaisons de séquences peptidiques, 4 homologues de Lrp présentent plus de 97% d'homologie, 11 entre 75% et 50%, et sur les 809 autres séquences la majorité présente 29% d'identité (Friedberg *et al.*, 2001). Voici quelques exemples : Lrp est une protéine hautement conservée chez *Enterobacter aerogenes* (100% d'homologie avec Lrp de *E. coli*), *Klebsiella aerogenes* (un résidu aminé différent comparé à Lrp de *E. coli*), *Salmonella typhimurium* (seulement 2 acides aminés de différents sur 164 par rapport à Lrp de *E. coli*) ainsi que chez *Proteus mirabilis* (97% d'homologie avec Lrp de *E. coli*) (Friedberg *et al.*, 1995; Hay *et al.*, 1997). Chez *Haemophilus influenzae*, LrfB qui possède 75% d'homologie avec Lrp de *E. coli*. Toutefois, le rôle fonctionnel de LrfB dans *H. influenzae* comparé à celui de Lrp chez *E. coli*, est moindre. En effet, seulement la production de l'asparagine synthétase et d'une autre protéine non identifiée est altérée dans une souche LrfB négative alors qu'en comparaison la production de 20 protéines est altérée dans une *E. coli* Lrp négative tel que déterminé par une étude en électrophorèse bidimensionnelle (Ernsting *et al.*, 1992; Friedberg *et al.*, 2001). LrpC de *Bacillus subtilis* (Gram+) est aussi un homologue de Lrp mais ne présente que 34% d'homologie avec Lrp de *E. coli* (Beloin *et al.*, 2000). Parmi les archéobactéries, LrpA de *Pyrococcus furiosus* présente 28% d'homologie avec Lrp. Comme Lrp, LrpA réprime la transcription de son propre gène indépendamment de la présence de leucine, mais on ne sait pas encore ce régulateur agit sur d'autres gènes, ni si son effet est modulé par la leucine (Brinkman *et al.*, 2000).

#### 4.2.1.2. Structure.

A l'aide de la technique de mutagenèse dirigée, il a été démontré que la protéine Lrp contient trois domaines fonctionnels de taille égale : un domaine amino-terminal responsable de la liaison à l'ADN, un domaine central impliqué dans l'activation de la transcription, et un domaine carboxy-terminal requis pour la réponse à la leucine

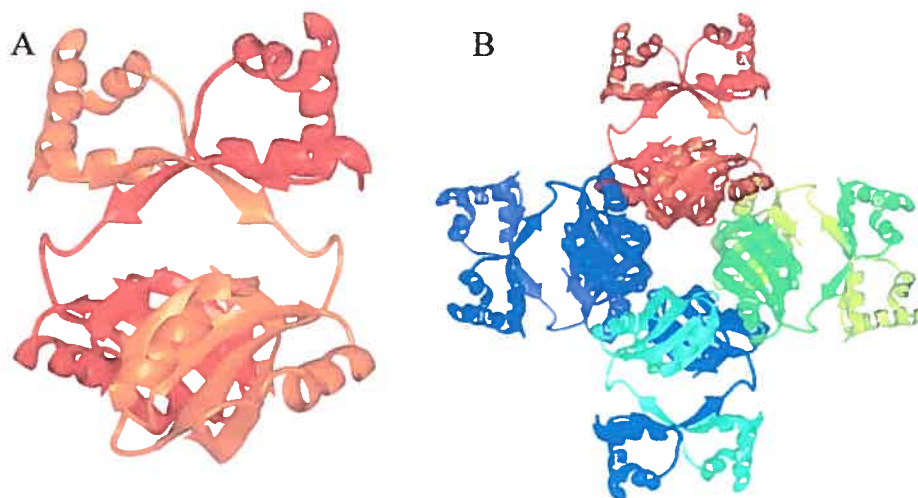
(Tableau 4) (Platko et Calvo, 1993). Lrp contient vraisemblablement un site de fixation au régulateur PapI, mais ce dernier n'a pu être identifié (Kaltenbach *et al.*, 1995; Kaltenbach *et al.*, 1998).

La structure tridimensionnelle de Lrp n'est pas connue mais celle de la protéine homologue LrpA de *Pyrococcus furiosus* a été déterminée par cristallographie (Fig. 13) (Leonard *et al.*, 2001; Sedelnikova *et al.*, 2001). LrpA possède 141 résidus aminés, a une masse de 15,9 kDa et présente 28 % d'homologie avec Lrp de *E. coli* (Brinkman *et al.*, 2000). Comme Lrp, LrpA réprime la transcription de son propre gène indépendamment de la présence de leucine (Brinkman *et al.*, 2000). Actuellement, le rôle de LrpA dans la régulation transcriptionnelle d'autres gènes n'a pas été étudié. On ne sait pas si la leucine peut ou non moduler l'action de LrpA comme elle le fait pour Lrp.



**Fig. 14:** Représentation schématisée de la structure tridimensionnelle de LrpA de *P. furiosus*. Les feuillets  $\beta$  sont dessinés comme des rubans bleus fléchés et les hélices  $\alpha$  sont dessinées en rouge. Tiré de Leonard *et al.*, 2001.

LrpA a été cristallographiée sous-forme d'octamère (= un tétramère de dimères). L'interaction entre deux sous-unités LrpA fait intervenir trois régions, principalement située dans la partie carboxy-terminale. Le contact entre 4 dimères permet la formation du complexe octamérique. Les contacts sont réalisés seulement entre les dimères adjacents (Fig. 14).



**Fig. 15:** Représentation schématique (A) d'un dimère de LrpA et (B) d'un octamère de LrpA. Chaque monomère est coloré différemment des autres. Tiré de Leonard *et al.*, 2001.

La comparaison de la structure de LrpA avec celle de la polymérase B de *Thermococcus gorgonarius*, de la protéine ribosomale S6 de *Thermus thermophilus* et de la protéine E2 de papillomavirus-1 bovin met en évidence des homologues de structure dans la partie carboxy-terminale comprenant les quatre feuillets  $\beta$  antiparallèles faisant face à deux hélices  $\alpha$ , soit  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  (Leonard *et al.*, 2001). Toutefois ces structures sont principalement impliquées dans des interactions ADN-protéine ou ARN-protéines alors que pour LrpA cela semble exclusivement réservé aux interactions entre monomères et dimères. Par analogie avec la structure tridimensionnelle de CRP, Leonard *et al.* ont déterminé un motif hélice tour hélice dans la région amino-terminale de LrpA devant être impliqué dans la fixation à l'ADN (Leonard *et al.*, 2001; Mc Kay et Steitz, 1981). Ce motif contient les résidus 21-40 de l'hélice  $\alpha$ B, suivit du tour puis de l'hélice  $\alpha$ C. Ce résultat concorde avec les travaux de mutagenèse sur Lrp de Platko et Calvo, démontrant que 10 résidus (13, 34, 40, 41, 44, 46, 48, 61, 65 et 70) sont impliqués dans la fixation de Lrp à l'ADN (Platko et Calvo, 1993).

effet	changement nucléotidique	changement d'acide aminé	acides aminés conservé (23 Lrp homologues)*	équivalent chez LrpA
modification de la liaison à l'ADN	G-37 T	Asp-13 Tyr	13 Asp ou Thr	Asp-3
	T-101 C	Leu-34 Pro	16 Asp	Ile-24
	C-118 T	Leu-40 Phe	19 Ile ou Leu	Ile-30
	T-121 C	Ser-41 Pro	20 Leu ou Ile	Ser-31
	C-130 T	Pro-44 Thr	23 Leu	Ala-34
	T-137 C	Leu-46 Pro	48 Arg	Arg-36
	C-142 T	Arg-48 Cys	52 Leu ou Met	Arg-38
	T-181 C	Tyr-61 His	56 G ou Q	Tyr-51
	T-194 C	Leu-65 Pro		Ile-55
	T-209 C	Leu-70 Pro		Leu-60
perte d'activation	T-227 C	Val-76 Ala	103 Ile ou Val 111 G ou N	Thr-66
	T-268 C	Phe-90 Leu		Leu-77
	T-337 C	Phe-113 Leu		His-100
	C-356 T	Thr-119 Ile		Ile-106
	T-373 C	Ser-125 Pro		Glu-112
perte de la réponse à la leucine	A-324 T	Leu-108 Phe		Leu-95
	C-342 G	Asp-114 Glu		Met-101
	T-407 G	Met-124 Arg		Gly-111
	T-371 G	Leu-136 Arg		Gly-123
	T-439 C	Tyr-147 His		Ala-134
	G-442 T	Val-148 Phe		Ile-135
	T-446 C	Val-149 Ala		Ile-136

**Tableau 4:** Classement des nucléotides et résidus aminés selon le domaine de fonction de Lrp, d'après l'étude de mutagenèse dirigée de Platko et Calvo (1993). Sont aussi indiqués les acides aminés les plus conservés parmi 23 homologues de Lrp, d'après Friedberg *et al.* 2001. Les résidus de LrpA de *Pyrococcus furiosus* équivalents des résidus mutés de Lrp de *E.coli* sont indiqués dans la dernière colonne, d'après Leonard *et al.*, 2001. \*Le premier acide aminé nommé est celui de Lrp de *E. coli*. En bleu, sont indiqués les acides aminés conservés parmi les différents homologue de Lrp. En rose, sont indiqués les acides aminés conservés qui ont été mutés dans l'étude de Platko et Calvo, 1993.



#### 4.2.1.3. Interaction Lrp-ADN.

Lrp est capable de se lier au niveau de sites spécifiques sur l'ADN double brin. Lrp possède la capacité de courber l'ADN de 52° en liant un site nucléotidique et de 135° en liant deux sites nucléotidiques adjacents (Wang et Calvo, 1993). Du fait du nombre important de gènes dont l'expression est régulée par Lrp, la séquence cible consensus définie pour Lrp a souvent été remaniée (Cui *et al.*, 1995; Rex *et al.*, 1991; Wang et Calvo, 1993). La dernière séquence consensus suggérée à partir de la comparaison de soixante-trois séquences d'ADN liant Lrp est : YAGHAWATTWTDCTR (Y=C ou T, H= pas G, W= A ou T, D= pas C, R= A ou G) (Cui *et al.*, 1995).

Chez l'opéron *ilvIH*, dont l'expression activée par Lrp est sensible à la leucine, la séquence consensus pour la liaison de Lrp à l'ADN contient le pentamère TTTAT. Celui-ci est aussi retrouvé chez les séquences similaires au consensus d'autres gènes du régulon Lrp tels que *tdh*, *lysU*, *livKHMGF* (Calvo et Matthews, 1994; Newman et Lin, 1996; Rex *et al.*, 1991). L'expression de *tdh*, *lysU* et *livKHMGF* est réprimée par Lrp et la leucine antagonise l'action de Lrp sur *tdh* et *lysU* mais renforce l'action de Lrp sur *livKHMGF* (Calvo et Matthews, 1994; Lin *et al.*, 1992b; Rex *et al.*, 1991). Chez l'opéron *pap*, dont l'expression est activée par Lrp et est insensible à la leucine, les sites de fixation de Lrp ne contiennent pas ce pentamère. En effet, la séquence consensus déterminée à partir des six sites de fixation de Lrp dans la région promotrice de *pap* est Gnn(n)TTT (Nou *et al.*, 1993; Nou *et al.*, 1995). Puisque les séquences diffèrent entre certains opérons, il semble donc que Lrp reconnaît soit une structure de l'ADN, soit un motif répétitif de A et de T. De plus, il semblerait que Lrp se lie à l'ADN d'une façon différente selon que les opérons sont sensibles (*ilvIH*, *lysU*) ou non à la leucine (*pap*) (Calvo et Matthews, 1994; Lin *et al.*, 1992b; van der Woude *et al.*, 1992). Par exemple, la fixation de Lrp à trois des six sites de liaisons de la région promotrice de *pap*, nécessite le couplage de Lrp à un autre régulateur (PapI). Or, dans le cas de *ilvIH* et *lysU*, Lrp n'interagit pas avec une autre protéine pour fixer tous les sites nucléotidiques (Lin *et al.*, 1992b; Wang et Calvo, 1993).

#### 4.2.1.4. Le régulon Lrp.

Une étude réalisée avec des puces à ADN contenant 98% des gènes de *E.coli* a montré qu'une déficience en Lrp affecte la transcription de 10% de ces gènes (soit 400) (Tani *et al.*, 2002). Parmi ces 400 gènes certains ne sont probablement pas soumis à une régulation directe par Lrp. Le nombre des gènes identifiés, dans une seconde étude utilisant les puces à ADN dont les résultats ont été réévalués sur la base d'une analyse statistique Bayésienne, n'est pas mentionné. Toutefois, une liste d'exemples est fournie (Hung *et al.*, 2002). L'expression de cent quarante huit de ces gènes est indépendante de la leucine (Tani *et al.*, 2002). Ces derniers travaux élargissent et confirment ceux précédemment obtenus par l'analyse protéomique de souches Lrp positives/Lrp négatives. En effet, l'étude protéomique a montré que la synthèse de vingt protéines était modifiée en présence de leucine et celle de dix autres l'était en absence de leucine (Ernsting *et al.*, 1992). D'autre part, l'analyse de la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes a permis d'identifier une partie du régulon Lrp qui contient les gènes régulés directement par Lrp. Le tableau 5 présente les résultats des différents travaux. La protéine Lrp est un régulateur global du métabolisme des acides aminés, du métabolisme énergétique et carboné, de certains systèmes de transport, de l'expression de différentes structures cellulaires (fimbriae, porines, flagelle), de la synthèse ou de la dégradation de macromolécules (ADN), de la réponse aux stress environnementaux et de sa propre expression (Hay *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 2002; Newman et Lin, 1995). Lrp serait aussi impliquée dans la compaction du chromosome bactérien, car elle a la propriété de courber l'ADN et appartient au groupe des « histone-like proteins » (Newman et Lin, 1995; Wang et Calvo, 1993).

Locus	Produit	Effet de Lrp	Effet de la leucine sur la régulation exercée par Lrp
<b>Biosynthèse des petites molécules et transport</b> Synthèse des Acides aminés <i>glnALG</i> <i>glfBDF</i> <i>glyA</i> <i>ilvIH</i> <i>leuABCD</i> <i>serA</i> <i>asd, dapA, gdhA, hisG, ilvG, pheA, proB, serA, thrL</i>	glutamine synthase et gènes régulant glnA glutamate synthase sérine déhydroxyméthyltransférase AHAS enzyme de la voie de biosynthèse de la leucine D-3-Phosphoglycérate déshydrogénase	? activation répression activation activation activation	? antagonise ? antagonise ? antagonise
Dégénération des Acides aminés <i>dadAX</i> <i>gcv</i> <i>tdh, kbl</i> <i>sdaA</i> <i>sdaC</i>	utilisation de l'alanine pour obtenir du pyruvate et de l'ammonium voie du clivage de la glycine thréonine déshydrogénase, 2-amino-3-cétobutyrate CoA ligase sérine déaminase	répression activation répression répression activation	antagonise pas d'effet antagonise antagonise ?
Métabolisme central intermédiaire <i>gltD, hdhA</i> Biosynthèse des cofacteurs <i>folE, gst, grxB, trxA</i> Transport <i>artI, artP, ascF, bcp, dppB, fin, galP, glnH, malE, polG, potH, sbp</i> <i>liv KHMGE</i> <i>livJ</i> <i>micF</i> <i>ompC</i> <i>ompF</i> <i>oppABCD</i>	protéine de liaison pour le transport de la leucine et des acides aminés branchés protéine de liaison pour le transport de l'isoleucine, la valine et la leucine ARN antisens inhibiteur transcriptionnel de ompF porine de la membrane externe C porine de la membrane externe F protéine de liaison et composés de la membrane pour le transport des oligopeptides	répression répression répression activation répression	renforce renforce pas d'effet ? ?
<b>Métabolisme énergétique et du carbone</b> Catabolisme des composés carbonés <i>malP, manA</i> Métabolisme énergétique <i>glpD, gltA, nirB, ppc</i>			

Locus	Produit	Effet de Lrp	Effet de la leucine sur la régulation exercée par Lrp
<b>Biosynthèse des macromolécules</b> Synthèse et structure de l'ADN <i>himD, hns, hupB</i> <i>pnt</i> Traduction <i>clpA, pepD, rmf, rpmI</i> <i>lysU</i> <i>W</i> protéine Régulation Régulateur <i>phoP, rpoE, rpoS, rseA</i> Réponse au stress <i>ahpC, cpxP, dnaK, sodA, uspA</i> Structure cellulaire <i>ompT, ompX, slp</i> Synthèse des Pili <i>clp</i> <i>daa</i> <i>fae</i> <i>fan</i> <i>fim</i> <i>foo</i> <i>tot</i> <i>pap</i> <i>sfa</i>	pyridine nucléotide transhydrogénase lysyl-t-RNA synthase forme II requise pour la traduction efficace de certains ARN messagers	activation répression ? répression activation répression activation activation ? activation activation répression répression	antagonise antagonise ? renforce pas d'effet pas d'effet antagonise renforce antagonise ? pas d'effet renforce pas d'effet ?
<b>Transposons</b> <i>insB_6, rhsD, tra5_4, trs5_11</i> <b>Divers</b> <i>b0667, b0703, b1685, b2253, b2254, b2294, b2595, hdeA, hdeB, yadF, yafK, yajC, ybeD, yccA, ydaA, ydaR, ydhD, yeeX, yggB, yggV, yhbH, yhiX, yhiE, lrp, osmY</i>	Lrp OsmY,	répression répression	pas d'effet ?

**Tableau 5** : Le régulon Lrp. En bleu, sont indiqués les gènes, dont l'expression varie lorsque l'on compare le profil d'expression entre une souche Lrp positive et une souche Lrp négative, identifiés par l'étude avec des puces à ADN, Hung *et al.*, 2002. D'après Newman et Lin , 1995 ; Calvo et Matthews, 1994.

#### 4.2.1.5. Classement du régulon de Lrp selon l'effet de Lrp et de la leucine.

Lrp régule positivement l'expression des opérons comme *papBA*, qui code pour le pili Pap, comme *gltBDF*, qui code pour les enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote, ou encore des gènes *fimB* et *fimE* impliqués dans la variation de phase des pili de type I (Ernsting *et al.*, 1993; Nou *et al.*, 1993; Roesch et Blomfield, 1998). Lrp régule négativement l'expression d'opérons comme *sda*, dont les produits des gènes sont impliqués dans le catabolisme de la sérine, *livJ*, impliqué dans le transport d'acides aminés, ou encore du gène *ompC* qui code pour une porine (Calvo et Matthews, 1994; Ernsting *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1990). Une caractéristique de Lrp est de pouvoir se lier à la L-leucine et à la L-alanine mais pas aux formes D de ces mêmes acides aminés (Chen et Calvo, 2002; Zhi *et al.*, 1999). En présence de certaines concentrations de L-leucine dans le milieu de culture, l'expression d'opérons contrôlés par Lrp peut être modifiée. En effet, en présence de leucine, le contrôle négatif exercé par Lrp peut être soit renforcé, soit diminué. Il en est de même pour le contrôle positif. Dans d'autres cas, la présence de leucine dans le milieu n'a aucun effet sur l'action de Lrp (Calvo et Matthews, 1994; Newman et Lin, 1995) (Tableau 5).

Lrp régule de façon générale le métabolisme de *Escherichia coli* en fonction de la disponibilité des acides aminés et des autres sources d'azote du milieu. Comme c'est le cas pour plusieurs régulateurs transcriptionnels, Lrp s'autorégule négativement. Son expression n'est pas affectée par la présence de leucine et se trouve fortement réprimée en milieu riche (Lin *et al.*, 1992a; Wang *et al.*, 1994). Lrp est synthétisée en grande quantité par les bactéries en phase de croissance exponentielle, cultivées en milieu pauvre (3200 dimères/cellule), et en milieu riche, sa production est moindre en phase de croissance exponentielle (1200 dimères / cellule) et chute en phase de croissance stationnaire (120 dimères / cellule) (Azam et Ishihama, 1999; Landgraf *et al.*, 1996).

#### 4.2.1.6. Mécanisme d'action de la leucine et de l'alanine.

L'effet de la leucine sur la structure de LrpA n'a pas été étudié. Dans le cas de Lrp, on sait que les résidus Leu108, Asp114, Met124, Leu136, Tyr147, Val148, Val149 sont impliqués dans la réponse à la leucine (Platko et Calvo, 1993; Willins *et al.*, 1991). Or, par analogie avec la structure de LrpA, 5 de ces résidus seraient impliqués dans l'interface de dimérisation et 2 interviendraient dans l'interface dimère-dimère (Tableau 4). Willins *et al.* (1991) formulent l'hypothèse que l'interaction directe de la leucine et de l'alanine avec Lrp pourrait empêcher sa liaison pour certains de ses sites nucléiques de fixation, ce qui antagoniserait l'action du régulateur. Jusqu'à présent aucune étude n'a pu démontrer comment ces deux acides aminés peuvent renforcer l'action de Lrp.

Chen *et al.* ont démontré qu'en solution Lrp se trouve sous forme d'hexadécamères en absence de leucine et sous forme d'octamères en sa présence. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que la leucine, en permettant la dissociation des complexes de Lrp en octamères, potentialiserait l'action de Lrp (Chen *et al.*, 2001).

Une autre hypothèse est que la déformation des dimères de Lrp par un des acides aminés conduirait à une conformation tridimensionnelle des dimères qui confère plus d'affinité pour certains sites de fixation.

#### 4.2.1.7. En conclusion.

L'analyse des variations de concentration de Lrp couplée à l'étude des opérons qu'elle régule, a conduit à l'hypothèse de « festin *versus* famine » :

- en milieu pauvre, Lrp induit l'expression des gènes dont les produits sont nécessaires en période de carence nutritionnelle, par exemple les enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés; et elle réprime l'expression des gènes codant pour des protéines seulement utiles lors de la croissance en milieu riche, comme les systèmes de transport et les porines impliqués dans l'absorption des acides aminés ainsi que les enzymes impliquées dans la dégradation des acides aminés.

- en milieu riche, Lrp n'est plus en assez grande quantité pour réprimer l'expression des gènes dont les produits sont nécessaires à la croissance en période d'abondance nutritionnelle et pour stimuler l'expression des gènes codant les produits nécessaires à la survie et à la croissance en période de carence nutritionnelle (Calvo et Matthews, 1994).

L'expression de la plupart des opérons codant pour les fimbriae est affectée par Lrp et généralement une souche *lrp* négative ne peut plus synthétiser le fimbriae à l'exception de CS31A et K88 (Huisman *et al.*, 1994; Martin, 1996). Ceci conduirait à une moindre adhésion des bactéries aux tissus animaux. Par exemple, dans le sang, qui est un environnement où les nutriments sont facilement accessibles, une synthèse importante de fimbriae est moins critique pour la survie puisque la croissance rapide des microorganismes doit permettre de maintenir leur présence dans l'hôte. Par contre, dans le gros intestin, bien que les nutriments soient en abondance suite à l'ingestion de nourriture par l'hôte, une bactérie, venant d'arriver entre en compétition avec la flore intestinale pour survivre et croître dans cet environnement. Cet environnement n'est pas pauvre d'un point de vue nutritif mais limitant. Une plus forte production du fimbriae durant la croissance intestinale favoriserait une meilleure adhésion aux cellules épithéliales, et donc la maintenance de la bactérie dans l'hôte.

#### 4.2.2. Déoxyadénosine méthylase.

La protéine Dam, ou Déoxy-adénosine méthylase, méthyle les résidus adénosine en position N-6 des séquences 5'-GATC-3' de l'ADN, en prenant le groupement méthyle à la S-adénosyl-méthionine. On retrouve de nombreux homologues de cette enzyme chez les bactéries entériques telles que *E. coli*, *Salmonella* spp, *Serratia marcescens*, *Yersinia* spp, *Vibrio cholerae*, ainsi que parmi le genre *Neisseria*. La méthylation des sites GATC est impliquée dans la coordination des événements cellulaires tels que la réplication de l'ADN, la correction des mésappariements, la transposition, la ségrégation chromosomique, la transcription de certains gènes. De façon générale, tous les sites GATC sont méthylés sur l'ADN. Ceci permet d'assurer la fidélité de la réplication de l'ADN chromosomique (Boye et Løbner-Olesen, 1990; Low *et al.*, 2001). En effet, lors de la réplication, le brin néo-

synthétisé n'est pas méthylé immédiatement. L'ADN polymérase peut ainsi différencier le brin néo formé du brin matrice qui est méthylé, et exercer sa fonction d'édition sur le premier. Il a été démontré que la transposition de *Tn10*, *Tn5* et *Tn903* est plus fréquente dans les mutants *dam* négatifs. En effet, lorsque Dam méthyle des sites présents dans le promoteur du gène codant pour la transposase, il y a répression de sa transcription et donc inhibition de la transposition de *Tn10* (Roberts *et al.* 1985, Yin *et al.* 1988).

La plupart des 18 000 sites GATC estimés chez *E. coli* sont méthylés par Dam (Hattman *et al.*, 1978). Cependant, quelques très rares sites GATC (environ 50) ne sont pas méthylés en permanence sur le chromosome d'*E. coli* (Hale *et al.*, 1994 ; Ringquist et Smith, 1992 ; Tavazoie et Chirch, 1998). Leur état de méthylation varie selon le milieu de croissance et la phase de croissance. Les modifications de la méthylation de ces sites seraient dues soit à la liaison de protéines régulatrices telles que Lrp, GutR, OxyR aux sites GATC, empêchant alors leur méthylation, ou à des changements conformationnels de l'ADN près des sites GATC se produisant de façon naturelle ou étant induits par des protéines (Blyn *et al.*, 1990; Haagmans et Van Der Woude, 2000; Polaczek *et al.*, 1998; van der Woude *et al.*, 1998; Waldron *et al.*, 2002). Parmi les 50 sites GATC dont l'état de méthylation est fonction des conditions environnementales, certains sont impliqués dans des mécanismes de régulation transcriptionnelle. En effet, les deux sites GATC espacés de 102 pb dans la région régulatrice de l'opéron *pap* sont impliqués dans le mécanisme de variation de phase contrôlant cet opéron. La compétition entre Dam et OxyR pour deux sites GATC situés entre le promoteur et le gène *agn 43*, détermine l'activité du promoteur (phase ON ou phase OFF). Si les deux sites sont méthylés, le promoteur est actif (phase ON), alors que si les deux sites sont occupés par OxyR, la transcription est bloquée (phase OFF). Il est à remarquer que les adénosines de ces deux sites GATC sont tout particulièrement impliquées dans la fixation de OxyR (Waldron *et al.*, 2002). Toutefois, tous les sites GATC dont la méthylation est bloquée par un régulateur ne sont pas forcément impliqués dans la régulation transcriptionnelle. Par exemple, GutR empêche la méthylation du site GATC situé 44 pb en amont de l'opéron *gut*, mais la fixation de GutR n'est pas bloquée par la méthylation de ce même site, et aucun impact n'est observé sur la transcription de *gut* (van der Woude *et al.*, 1998); la fixation du régulateur transcriptionnel CRP au niveau d'un site GATC n'empêche pas la méthylation de ce site (Low *et al.*, 2001).



### 4.2.3. CRP, « cAMP receptor protein ».

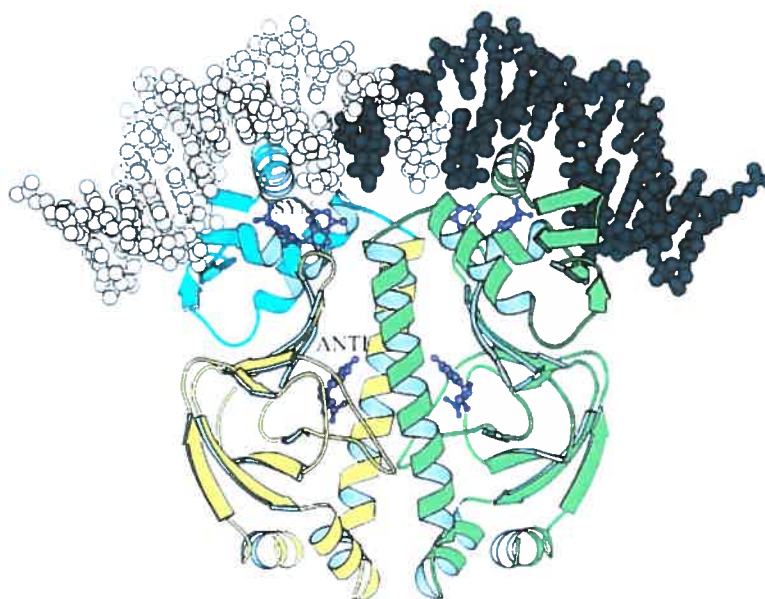
CAP, « catabolite gene activator protein », ou CRP, « cAMP receptor protein », est un régulateur transcriptionnel qui lie spécifiquement sous forme de dimères des séquences d'ADN. Cette protéine a aussi la capacité de fixer de l'AMP cyclique (Busby et Kolb, 1996).

CRP régule la transcription de nombreux opérons (environ 74 opérons), en activant ou réprimant leur expression. Ces gènes codent pour :

- des protéines impliquées dans le catabolisme des sucres alternatifs au glucose, ou des acides aminés, ou des nucléosides
- des protéines membranaires impliquées dans le transport de métabolites
- des régulateurs spécifiques d'opéron.

#### 4.2.3.1. Structure.

La structure tridimensionnelle de cette protéine de 209 acides aminés a été déterminée par diffraction aux rayons X (Weber et Steitz, 1987). CRP contient deux domaines. Le domaine amino-terminal, qui est le plus grand (résidu 1-133), est capable de lier l'AMPc via principalement deux sites et permet la dimérisation de CRP, alors que le petit domaine carboxy-terminal (résidu 139-209) porte le motif hélice-tour-hélice permettant la fixation à la cible nucléotidique. Les deux domaines sont reliés de manière covalente par la région appelée charnière (résidu 134-138) (Fig. 15) (Passner *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 1991; Weber et Steitz, 1987). Pour agir le dimère CRP doit fixer un cofacteur qui est l'AMPc. Cette fixation induit un changement de conformation de CRP qui devient alors capable de lier une cible ADN (Dong *et al.*, 2002). La séquence d'ADN cible contient 22 paires de base et est palindromique : aaaTGTGAtnt-anaTCACAttt (Berg et von Hippel, 1988; Ramseier et Saier, 1995). Ainsi la fixation des dimères de CRP à l'ADN est symétrique et induit une courbure de 90°.



**Fig. 16 :** Schéma de l'interaction entre un dimère de CRP-AMPc et sa cible ADN. Deux molécules d'AMPc (en rose) sont liées à chaque monomère, l'une est nommée SYN et l'autre ANTI. En vert, un monomère interagit avec le demi-site nucléotidique noir. En jaune, est indiqué le domaine amino-terminal de CRP. En bleu, le domaine carboxy-terminal contient le motif HTH et lie le demi site nucléotidique blanc. Tiré de l'étude en cristallographie réalisée par Passner et Steitz, 1997.

#### 4.2.3.2. Fonction et classes (répression catabolique).

La concentration intra-bactérienne en AMPcyclique varie en fonction du milieu de croissance notamment en présence de glucose cette concentration chute. Une forte concentration en glucose dans le milieu externe va causer une diminution de l'AMPc intracellulaire, donc une diminution des complexes CRP-AMPc, et ainsi les promoteurs CRP-dépendants ne seront pas induits. De façon réciproque, l'absence de glucose induit la production d'AMPc, qui est suivie par la formation des complexes CRP-AMPc qui vont induire les promoteurs des gènes codant le plus souvent pour des enzymes impliquées dans le catabolisme des sucres alternatifs au glucose (Saier, 1993).

La répression catabolique par le glucose ne s'exerce pas seulement au niveau transcriptionnel par l'intermédiaire de CRP. En effet, la protéine Cra, « Catabolite

repressor/activator protein », est impliquée dans les mécanismes de répression catabolique par le glucose indépendant de l'AMPc (Saier et Ramseier, 1996).

Il existe plusieurs modes d'action de CRP :

- i. Activation simple du promoteur cible ;
- ii. Activation complexe à l'aide de plusieurs protéines ;
- iii. Répression

(i) Les promoteurs requérant seulement CRP pour leur activation transcriptionnelle sont classés en deux classes. La classe I comprend les promoteurs dont le site nucléotidique de fixation à CRP est situé en amont du site de fixation de l'ARN polymérase sous la condition que ces deux sites soient sur la même face de l'hélice d'ADN. Le site de liaison de CRP à l'ADN est donc soit situé aux environs de -61,5, -72,5, -82,5 ou -92,5. La région activatrice de la sous-unité du dimère de CRP proche du promoteur est alors requise pour interagir avec l'ARN polymérase. Les promoteurs de classe II montrent un chevauchement des sites nucléotidiques de fixation de CRP et de l'ARN polymérase en -35. A l'opposé des promoteurs de classe I, c'est la région activatrice de la sous-unité du dimère de CRP éloignée du promoteur qui est requise pour interagir avec l'ARN polymérase (Zhou *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994). Si en général, les promoteurs de ce mode de régulation ne présentent qu'un site de fixation de CRP, il existe certaines exceptions. Notamment la région régulatrice de *cdd* contient deux sites de fixation de CRP. L'activation optimale de *cdd* requiert la fixation de deux sites. Ce mécanisme synergistique semble faire interagir les deux dimères CRP avec chacun un domaine de l'ARN polymérase (Holst *et al.*, 1992).

(ii) Certains promoteurs dépendant de CRP sont co-régulés avec un second activateur. En général, ce second activateur lie l'ADN proche du site de fixation de l'ARN polymérase et un peu en aval du site de fixation de CRP. Il existe trois types de co-régulation. Dans le premier type, l'activateur 1 lie l'ADN sans pouvoir induire la transcription et requiert donc la fixation de l'activateur 2 à son site pour être repositionné de façon à induire la transcription. C'est le cas de l'activation de *malK* (Richet et Raibaud, 1991). Dans le second type, il n'y a pas nécessité d'un repositionnement mais que chacun des deux activateurs soient présents pour interagir avec leurs domaines respectif de l'ARN polymérase. C'est le cas de l'activation de *araFG* (Hendrickson *et al.*, 1990). Dans le troisième type, il s'agit en fait pour CRP de permettre l'action d'autres activateurs en déstabilisant la conformation tridimensionnelle de l'ADN régit par une protéine répresseur. C'est le cas du promoteur de l'opéron *pap*, dont la régulation est décrite au chapitre suivant.

(iii) CRP peut aussi agir comme répresseur. Simplement en fixant une séquence recouvrant le site  $-10$  du promoteur cible et donc en bloquant l'accès à l'ARN polymérase (Busby et Kolb, 1996). L'autorépression de *crp*, dépend d'un autre mécanisme. Dans ce cas CRP fixe un site 42 pb en aval du site d'initiation de la transcription de *crp* pour permettre l'activation d'un autre promoteur divergent. La polymérase va alors en transcrivant l'autre gène encombrer le gène *crp* et donc bloquer sa transcription. Un autre mécanisme de répression par CRP fait intervenir un co-répresseur, CytR. Dans ce cas, la fixation de CRP à un seul site de la région régulatrice active la transcription de l'opéron concerné. Dès qu'un second dimère de CRP se fixe au second site disponible, alors CytR peut interagir avec les deux dimères de CRP en se plaçant entre les deux. Ainsi, CytR bloque la transcription du gène cible (Kallipolitis *et al.*, 1997).

#### 4.2.3.3. Effet de CRP sur les opérons *pap* et *foo*.

La variation de phase régit le premier niveau de régulation transcriptionnelle de l'opéron *pap*. La fixation de Lrp, PapI et la méthylation par Dam d'un des deux sites GATC de la région régulatrice de *pap* permet alors la transition de phase vers soit la phase OFF soit la phase ON (Herdnay *et al.*, 2002). Ce mécanisme est indépendant de CRP et la fixation de CRP à son site est indépendante de Lrp (Weyand *et al.*, 2001). Lorsque l'opéron *pap* est en phase ON, sa transcription dépend de la co-activation par CRP et PapB (Braaten *et al.*, 1991; Göransson *et al.*, 1989a; Nou *et al.*, 1993). L'intervention de CRP est cruciale pour l'activation de *pap*, car en absence de CRP et en présence de forte concentration de PapI la transcription de *pap* reste bloquée (Weyand *et al.*, 2001). L'opéron *pap* et *papI* sont alors transcrits. Le site de liaison à l'ADN pour le complexe CRP-AMPc est situé à 2 pb en aval du premier site de fixation de PapB, à environ 50 pb en amont du site GATC 1 et à environ 215 pb du promoteur de *papB* (Weyand *et al.*, 2001). L'approche des hétérodimères orientés (CRP sauvage couplé à CRP AR1-muté) a permis de démontrer que la région AR1 de CRP proche du promoteur de *pap* est requise pour stimuler la transcription de *pap*, et ceci même en l'absence de H-NS (Weyand *et al.*, 2001). Or il a été démontré qu'en absence de H-NS, protéine structurant la conformation de l'ADN, l'activation de *pap* ne requiert plus la présence de CRP. Il est probable que CRP modifie

suffisamment la conformation de l'ADN normalement obtenue via H-NS pour faciliter l'action de PapB.

#### **4.2.4. H-NS.**

H-NS, « Histone-like Nucleoid Structuring protein », est une protéine de 16 kDa, neutre, du nucléoïde. C'est la seconde protéine de type histone la plus abondante chez *E. coli* après la protéine HU. H-NS lie l'ADN double brin courbé et l'ARN de façon aspécifique et affecte la structure de l'ADN en le compactant fortement (Schröder et Wagner, 2002).

##### **4.2.4.1. Structure.**

H-NS présente de nombreux homologues chez différentes espèces bactérienne, mais a aussi un homologue chez *E. coli*, StpA (58% d'homologie) (Bertin *et al.*, 2001). H-NS et StpA autorégulent leur expression mais aussi se régulent de manière croisée (Free et Dorman, 1997 ; Schröder et Wagner, 2002). Free *et al.* ont démontré que H-NS et StpA se dimérisent. H-NS contient deux domaines connectés par un fragment peptidique très flexible (1998). Le domaine amino-terminal permet l'oligomérisation de H-NS, alors que le domaine carboxy-terminal lie les acides nucléiques. Le domaine de fixation à l'ADN ne contient pas de structure caractéristique de cette fonction mais est hydrophobe et contient quatre boucles en plus de quelques feuilletts  $\beta$  et hélices  $\alpha$ . La séquence fixée est généralement riche en A T.

H-NS est présente en solution sous forme de dimères ou de structure de plus haut niveau, des oligomères (jusqu'à 20 molécules associées) (Smyth *et al.*, 2000). Même si le monomère H-NS peut se lier à l'ADN, le complexe ADN-protéine est plus stable quand H-NS est sous forme d'oligomère (Schröder et Wagner, 2002).

L'évaluation de la quantité de molécule de H-NS par cellule est contradictoire (60 000 à 20 000) (Azam et Ishihama, 1999; Free et Dorman, 1997; Sonnenfield *et al.*, 2001; Schröder et Wagner, 2002).

#### 4.2.4.2. Fonction.

H-NS compacte l'ADN. Cette altération de la super-hélicité de l'ADN est réalisée en introduisant des super-tours négatifs et des courbures. H-NS régule aussi la transcription de nombreux gènes, le plus souvent en réprimant leur expression. Directement ou indirectement, H-NS, dans un milieu faible en nutriment, régule l'expression de 5% des gènes de *E. coli* et module la production de 60 protéines (dont ProX, Gnd, GadA, HdeA, CbpA). 30 % de ces protéines sont impliqués dans la formation de l'enveloppe cellulaire (LPS) et dans l'adaptation aux conditions environnementales, 20 % sont des protéines impliquées dans la transcription et la traduction (Hommais *et al.*, 2001). Les conditions environnementales affectant l'expression de gènes médiée par H-NS, sont la température, le pH, la pression osmotique et l'oxygène. H-NS est parfois impliquée dans la régulation de l'expression génétique de facteurs de virulence comme des fimbriae ou des flagelles (thermorégulation des opérons *pap*, *daa*, *sfa*, *fim* et de *fliC* chez *E. coli*) (Göransson *et al.*, 1990; Harel et Martin, 1999; Landini et Zehnder, 2002; Morschhäuser *et al.*, 1993a; Olsen *et al.*, 1998; White-Ziegler *et al.*, 2000). H-NS et son paralogue StpA contrôlent d'une part des gènes communs, mais d'autre part, StpA à la différence de H-NS, agit comme une protéine chaperon de certains ARN. De plus, H-NS réprime l'expression de gènes impliqués dans la résistance au choc acide (*hdeA*, *gadA* et *gadC*) et active la transcription de gènes codant pour l'assemblage du flagelle (*flgH*, *fliC* et *flgA*) alors que StpA n'a aucun effet (Bertin *et al.*, 2001; Schröder et Wagner, 2002). H-NS en se fixant à StpA, empêche la protéolyse de StpA par la protéase Lon (Johansson *et al.*, 2001). De plus, l'hétérodimère H-NS-StpA pourrait avoir un rôle fonctionnel dans la régulation transcriptionnelle de certains cistrons. En effet, l'étude de la répression transcriptionnelle de *bgl* et de *proU* par H-NS et StpA a démontré que H-NS tronqué de son domaine de fixation à l'ADN en présence de StpA peut encore inhiber la transcription de *bgl* mais pas celle de *proU* (Free *et al.*, 1998).

Le mécanisme moléculaire par lequel H-NS régule la transcription n'est pas connu. Plusieurs hypothèses ont été émises (Hommais *et al.*, 2001; Schröder et Wagner, 2002) :

- H-NS affecterait l'expression en modulant le degré de sur-enroulement de l'ADN requis pour la transcription,
- l'inhibition transcriptionnelle directe pourrait résulter de la liaison de H-NS à l'ADN qui fonctionnerait comme répresseur et interférerait avec la formation de promoteurs ouverts,
- H-NS pourrait empêcher l'ARN polymérase d'interagir avec le promoteur de façon productive.

De plus, il a été montré que H-NS module l'expression de certains gènes, de façon post-transcriptionnelle, en altérant la stabilité des ARNm et en affectant l'efficacité de la traduction (Bertin *et al.*, 2001).

#### **4.2.4.3. Effet de H-NS sur l'opéron *pap*.**

Les fimbriae P sont produits par des cellules se multipliant à 37°C mais pas à des températures plus basse comme 25°C (Göransson et Uhlin, 1984). H-NS joue un rôle important dans cette thermorégulation en réprimant la transcription de deux gènes codant pour des régulateurs positifs (PapI et PapB) de l'expression de l'opéron *pap*. PapI permet le passage du promoteur de *pap* en phase d'expression (phase ON). Or dans une souche *hns* négatif, aussi bien à 37°C qu'à 26°C, le gène *papI* n'est plus réprimé (Göransson *et al.*, 1990). De plus, la transcription de *papBA* est elle aussi dé-réprimée aux deux températures mais moins intensément. Des expériences de retard sur gel compétitif ont démontré que H-NS fixe spécifiquement la région régulatrice de *pap* au niveau des deux sites GATC, et que cette fixation bloque la méthylation de ces deux sites à 23°C et non à 37°C. L'hypothèse émise suggère que la température affecte directement l'état d'oligomérisation de H-NS et donc sa capacité à réprimer la transcription de *pap* à 23°C (White-Ziegler *et al.*, 1998). Cette même étude démontre aussi qu'en l'absence de modification des conditions environnementales H-NS est un régulateur positif de l'expression de *pap*. En effet, la comparaison de souche sauvage et d'une souche *hns* négative montre qu'à 37°C, H-NS

favorise le nombre de cellules en phase ON et donc permet une augmentation de l'expression de *pap*.

H-NS est aussi impliqué dans la répression transcriptionnelle de l'opéron *pap* en réponse à d'autres conditions environnementales comme une forte pression osmotique, un milieu de croissance riche en nutriment et l'utilisation du glucose comme source de carbone (White-Ziegler *et al.*, 2000).

#### 4.2.5. RimJ.

RimJ est une acétylase qui modifie l'alanine située en amino-terminal de la protéine ribosomale S5. RimJ est impliqué dans la thermorégulation de l'opéron *pap*, ainsi que dans la répression de son expression en milieu nutritif riche et aussi en réponse à une plus forte pression osmotique (White-Ziegler et Low, 1992; White-Ziegler *et al.*, 2002). Bien que les opérons *fim*, *fan* et *daa* subissent un contrôle transcriptionnel en réponse à la température et aux conditions nutritives (riche ou pauvre) du milieu de croissance, leur transcription n'est pas affectée par RimJ. Cela semble indiquer que RimJ est un régulateur spécifique de la transcription de l'opéron *pap* (White-Ziegler *et al.*, 2002). RimJ, en l'absence de modification des conditions environnementales, réprime directement ou indirectement la transcription de *papI* et empêche la transition de la phase OFF à la phase ON de l'opéron *pap*. H-NS et RimJ semblent agir sur la régulation transcriptionnelle de *pap* indépendamment (White-Ziegler *et al.*, 2002). Le mécanisme moléculaire par lequel RimJ détecte un signal environnemental et régule la transcription de *pap* n'est pas encore connu. Toutefois, le fait que cette protéine puisse acétyler un résidu aminé pourrait être important pour l'activation d'une autre protéine régulant l'expression de *pap*. Cette acétylation ayant alors lieu seulement sous certaines conditions environnementales.



## PROBLEMATIQUE.

Les antigènes de surface F165<sub>1</sub> et CS31A sont produits par les souches *E. coli* associées à des diarrhées et des septicémies chez le porcelet et le veau (Bertin *et al.*, 1998; Bertin *et al.*, 2000; Contrepois *et al.*, 1989; Contrepois *et al.*, 1993; Fairbrother *et al.*, 1986; Girardeau *et al.*, 1988; Ngeleka *et al.*, 1993; Ngeleka *et al.*, 1994). Il a été aussi remarqué que certains *E. coli* causant des diarrhées ou des septicémies chez les humains produisent F165<sub>1</sub> et CS31A (Bertin *et al.*, 2000; Cherifi *et al.*, 1990; Jallat *et al.*, 1994). Des études suggèrent que F165<sub>1</sub> permet aux bactéries productrices de coloniser les organes extra-intestinaux et de résister à la phagocytose et que CS31A sert à la colonisation (Ngeleka *et al.*, 1993; Ngeleka *et al.*, 1994; Ngeleka et Fairbrother, 1999 Girardeau communication personnelle).

Les adhésines F165<sub>1</sub> et CS31A sont requises lors de l'étape primordiale du processus infectieux, mais leur synthèse n'est pas nécessaire en permanence. En effet, l'interaction hôte-pathogène est un processus dynamique dans lequel le pathogène rencontre diverses conditions environnementales auxquelles il s'adapte pour survivre. F165<sub>1</sub> et CS31A sont codés par les opérons *foo* et *clp* respectivement (Maiti *et al.*, 1994; Martin, 1996). Ces deux opérons font partie de la famille de régulation de l'opéron *pap* (Harel *et al.*, 2000; Herdnay *et al.*, 2002; Martin, 1996). La transcription de *foo*, *clp* et *pap*, est contrôlée par deux mécanismes : la variation de phase et le niveau de transcription. Contrairement à l'opéron *pap*, l'expression des opérons *foo* et *clp* est réprimée en présence de L-leucine ou de L-alanine (Harel *et al.*, 2000; Herdnay *et al.*, 2002; Martin, 1996). Ces deux mécanismes sont modulés en partie en réponse à certaines conditions environnementales telles que la présence de L-leucine ou de L-alanine dans le milieu de culture (Daigle *et al.*, 2000; Martin, 1996). Le mécanisme moléculaire par lequel ces deux acides aminés influencent l'expression de *foo* et *clp* est inconnu. Or, il a été démontré que la leucine et l'alanine interagissent directement avec Lrp et ainsi modifient l'action de Lrp envers certains promoteurs cibles en intensifiant ou en antagonisant l'effet de cette protéine régulatrice (Chen et Calvo, 2002; Zhi *et al.*, 1999). De plus l'action de Lrp sur l'expression de *foo* et *clp* est opposée (Daigle *et al.*, 2000; Martin, 1996). Comprendre comment des facteurs

présents dans l'environnement immédiat du pathogène peuvent réguler la synthèse de ces deux facteurs de virulence est important dans l'optique du développement de nouvelles drogues anti-infectieuses en alternative à l'utilisation d'antibiotiques.

Notre étude consiste en la comparaison de la régulation de l'expression des opérons *foo* et *clp*. Nous voulons déterminer d'une part si d'autres conditions environnementales telles que la température, le pH, la pression osmotique *etc...* ont un impact sur la transcription de ces deux opérons et d'autre part nous voulons caractériser les mécanismes moléculaires contrôlant la transcription de ces deux opérons en réponse à la présence de leucine ou d'alanine.

Pour répondre au premier objectif, l'effet de chaque condition environnementale sur la transcription basale et la variation de phase, en combinaison et séparément, est étudié à l'aide de souches portant des fusions transcriptionnelles contenant le gène rapporteur *lacZ*.

Le deuxième objectif est d'analyser les mécanismes moléculaires de l'effet de l'alanine et de la leucine sur la variation de phase et la transcription basale des fimbriae. Le rôle de protéines régulatrices impliquées dans le contrôle de la transcription basale et de la variation de phase sera aussi élucidé. L'effet de l'alanine et de la leucine en présence ou absence de ces régulateurs sera analysé *in vivo*.

Dans le troisième objectif, les séquences des régions de régulation des opérons fimbriaires auxquelles se lie Lrp, seront déterminées. De plus, l'influence de la présence des acides aminés alanine et leucine sur l'affinité de Lrp pour les séquences cibles sera aussi examinée, afin de déterminer si une interaction directe entre l'acide aminé et Lrp modifie l'action de Lrp, notamment en changeant son affinité pour une cible ADN donnée.

## SECTION II-Méthodologie et résultats

### **Implication de l'auteur dans cet article.**

En tant que premier auteur de cet article, j'ai réalisé la totalité des expériences de dosages  $\beta$ -galactosidase et de détermination de la variation de phase pour l'opéron *foo* à l'exception des souches DL844. $\lambda$ 01, DL844. $\lambda$ 02 et DL844. $\lambda$ 03. Les dosages de la  $\beta$ -galactosidase des souches MC4100. $\lambda$ 06, MC4100. $\lambda$ 15, DL844. $\lambda$ 06 et DL844. $\lambda$ 15 ont été aussi effectués par le premier auteur. Les courbes de croissances des souches MC4100. $\lambda$ 06, MC4100. $\lambda$ 15, MC4100. $\lambda$ 01, MC4100. $\lambda$ 02 ont été réalisées par le premier auteur. J'ai aussi construit les souches DL844. $\lambda$ 01, DL844. $\lambda$ 02 et DL844. $\lambda$ 03. Le premier auteur a aussi analysé la totalité des résultats et rédigé l'intégralité de cet article.

# 1. ARTICLE I : INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL CUES ON THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF *FOO* AND *CLP* CODING FOR F165<sub>1</sub> AND CS31A ADHESINS IN *ESCHERICHIA COLI*.

C. Crost <sup>1-2</sup>, F. Berthiaume <sup>2</sup>, A. Garrivier <sup>1</sup>, M.C. Tessier <sup>2-3</sup>, Harivony Rakotoharivonina<sup>1</sup>, J. Harel<sup>2</sup>, C. Martin <sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> INRA, Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup> GREMIP, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, CANADA

<sup>3</sup> Endocrine Genetics, Montreal Children's Hospital Research Institute, Montreal, CANADA

\*: corresponding author

Keywords : phase variation, environmental cues, fimbriae.

## 1.1. Abstract.

F165<sub>1</sub> and CS31A, belonging to the P-regulatory family, are bacterial adhesins synthesized by *E. coli* strains associated with septicemia in piglets. Transcriptional regulatory mechanisms controlling the *foo* and *clp* operons (encoding F165<sub>1</sub> and CS31A respectively) involve global regulators such as Lrp (leucine-responsive protein), and the specific regulators PapI and PapB homologues. Two types of regulation are exerted on the *foo* and *clp* expression: the first one modulates the activity of the promoter, controlling the synthesis level of adhesin in each individual cell; the second one is the phase variation control. Phase variation controls the percentage of cells producing the adhesin (ON cells) and non-producing adhesin (OFF cell) in a single colony. Analysis of expression of transcriptional fusions between the *fooB* or *fooI* promoters and *lacZ* as a reporter gene showed that Lrp and FooI activated the *foo* basal transcription and that they are necessary for phase variation mechanism which lead to a majority of ON cells. Lrp activates also *fooI* gene expression and is necessary for its phase variation. The *fooB* promoter activity is stronger than the *fooI* promoter activity. Influence of several environmental cues was tested on *foo* and *clp* expression. Inhibition or significant repression of *foo* and *clp* transcription

were observed at low temperature, in presence of glucose, in presence of alanine or leucine, and when cells were grown in LB medium. Osmolarity and pH had little effect. L-alanine, LB, and low temperature altered the phase variation from the *fooB* and the *clpB* promoters by increasing phase OFF cells or by locking in the OFF phase. Leucine had no effect on phase variation but repressed the basal transcription of both promoters. Glucose repression was totally relieved by addition of cAMP for the *foo* expression and only partially relieved for the *clp* expression. Environmental cues effects on phase variation or on basal transcription were independent of the respective PapI homologue (FooI or AfaF).

## 1.2. Introduction.

CS31A and F165<sub>1</sub> fimbriae produced by septicemic and diarrheic *Escherichia coli* belong to the P-regulatory family of adhesive factors. CS31A, encoded by the *clp* operon, is produced by septicemic and enterotoxigenic bovine *E. coli* (Girardeau *et al.*, 1988) and human strains (Jallat *et al.*, 1994). CS31A is required for full bacterial virulence in the rat model (Girardeau, personal communication). CS31A mediates adhesion to Caco-2 and Int-407 cells (Di Martino *et al.*, 1995; Jallat *et al.*, 1994), and protects bacteria from phagocytosis by bovine polymorphonuclear neutrophils (PMNs) (Girardeau, personal communication). F165<sub>1</sub>, encoded by the *foo* operon, plays an important role in the ability of bacteria to spread systemically through the porcine host (Ngeleka *et al.*, 1993). F165<sub>1</sub> fimbriae mediate adherence and survival of *E.coli* O115 to PMNs, and contribute to the bacterial inhibition of the porcine PMNs oxidative response (Ngeleka *et al.*, 1994; Ngeleka et Fairbrother, 1999).

Fimbrial operons belonging to the P-regulatory family such as CS31A and F165<sub>1</sub> share important regulatory features (Harel *et al.*, 2000). They are subject to phase variation control defined as the ability of cells to switch in a reversible manner between fimbriated phase ON cells and afimbriated phase OFF cells (Henderson *et al.*, 1999). Regulation of expression of these fimbriae involves Lrp, and a PapI homologue, encoded by a gene generally located upstream of the fimbrial operon. The Lrp target regulatory region contains two GATC sites that are spaced 102 or 103 bp apart (Båga *et al.*, 1985). The differential methylation status of these sequences determines the binding of Lrp, because

Lrp binds only non-methylated or hemi-methylated GATC sites (Nou *et al.*, 1993). PapI or its homologues possess the capacity to displace Lrp from a binding site to another (Crosth *et al.*, 2003; Nou *et al.*, 1995). All operons also encode for a PapB homologue, the role of which has not been extensively studied. Distinct regulatory features can also be observed between members of the P-regulatory family. In particular, Lrp activates expression of some operons, including *pap* and *foo* (Braaten *et al.*, 1992; Daigle *et al.*, 2000), and repress expression of others, including *clp* (Martin, 1996). Furthermore, expression of all the operons so far studied belonging to the P regulatory family is insensitive to leucine, except for the *clp* and *foo* operons. Indeed, leucine and alanine dramatically reduce CS31A and F165<sub>1</sub> production (Girardeau *et al.*, 1988; Harel *et al.*, 2000). Thus leucine and alanine potentiate the action of Lrp in the case of *clp* and antagonize it in the case of *foo*. We have shown previously that alanine represses basal *clp* transcription two-fold in the absence of a PapI homologue while it inhibits phase variation in its presence (Martin, 1996). L-alanine prevents the OFF to ON switch, locking *clp* expression in the OFF phase, whereas L-leucine represses transcription without major effects on the switch frequency. In addition, alanine and leucine also repress *clp* transcription by an Lrp-independent mechanism (Crosth *et al.*, 2003). The effect of leucine and alanine on *foo* phase variation is not characterised.

In this paper, our aim was to compare the effects of leucine and alanine in these two members of the P-regulatory family showing opposite Lrp regulatory patterns. In addition, several other environmental cues known to modulate fimbriae expression were also examined. To this end, we first characterised the role of Lrp and FocI in regulating *foo* expression. Then, the influence of carbon source, amino acids, temperature, pH, and osmolarity on the basal transcription and on the phase variation control of *clp* and *foo* was examined.

### **1.3. Materials and Methods.**

#### **1.3.1. Bacterial strains and media.**

*E. coli* strains Top10 and XL1 blue were used as recipients in molecular cloning experiments. *E. coli* strain MC4100 (Casadaban, 1976) and its isogenic mutant DL844

(*lrp::Tn10*) (Braaten *et al.*, 1994) were used as *Lrp*<sup>+</sup> and *Lrp*<sup>-</sup> host backgrounds for recombinant lysogenic  $\lambda$  phages. *E. coli* strains MC4100. $\lambda$ 6 and DL844. $\lambda$ 6 contain a single chromosomal copy of a *clpB-lacZYA* fusion (Fig. 1) (Martin, 1996). *ptrf1* is a multicopy recombinant plasmid derived from *ptrc99A* (Pharmacia Biotech) expressing *afaF* under the control of the *trc* promoter (Martin, 1996). The  $\lambda$ 01 phage contains a *fooB-lacZYA* fusion and the entire regulatory region, including the *fooI* and *fooB* genes, whereas the  $\lambda$ 02 phage contains a *fooB-lacZYA* fusion and the entire regulatory region including *fooB* but missing *fooI*. The  $\lambda$ 03 phage contains a *fooI-lacZYA* fusion and the entire regulatory region, including *fooI* and *fooB*. These phages were used to lysogenise MC4100 and DL844, leading to MC4100. $\lambda$ 01, MC4100. $\lambda$ 02, MC4100. $\lambda$ 03, DL844. $\lambda$ 01 DL844. $\lambda$ 02 and DL844. $\lambda$ 03 strains (Fig. 1 and Table 1).

Luria-Bertani (LB) broth, LB agar, M9 minimal broth and M9 minimal agar were prepared according to Miller (Miller, 1972). Glycerol and glucose as carbon sources were added at 0.2% (w/v). Supplements, when appropriate, were used at the following concentrations: Xgal, 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; IPTG, 1 mM, amino acids, 5 mM; ampicillin, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; kanamycin, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; streptomycin, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; tetracycline, 17.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  cAMP, 30 mM. L-Isoleucine (0.04 mM) and L-valine (0.06 mM) were added to media containing L-leucine. pH and osmolarity of the M9 medium are 7 and 215 mosM respectively. The pH varied upon addition of the following buffering solutions: MOPS, pH 7.9; Hepes, pH 6.4; TES, pH 5.8, each 100 mM final concentration. The osmolarity varied upon addition of NaCl at the following final concentrations: 50 mM: 300 mosM, 150 mM: 450 mosM and 225 mM: 600 mosM. Cultures of strains harboring *ptrf1* were done without IPTG to avoid too high an expression of *afaF*.

### 1.3.2. Construction of single copy *foo-lacZ* fusion lysogens.

PCR products containing either *fooI* or *fooI'*, the intergenic region, *fooB* and *fooA'* were cloned into the pGem vector (Promega, Charbonnieres, France). Primers used were: *FooI* forward which has a *BamHI* restriction site at the 5' end (5'-GGATCCTTTTATCTGTTTCAG-3'), *FooI* INI forward with a *BamHI* restriction site at the 5' end (5'-GGATCCGTATTCACTCATCTCACTG-3'), and *FooB* reverse which has a



*Bgl*III restriction site at the 5' end (5'-AGATCTACTGTTCTGATATT-3'). The 1038 bp PCR fragment containing *fooI*, the intergenic region and *fooB* was obtained using *FooI* forward and *FooB* reverse. The 787 bp PCR fragment containing *fooI'*, the intergenic region and *fooB* was obtained with *FooI* INI forward and *FooB* reverse. The PCR program used was : 94°C 5 min, 30 cycles 94°C 30 sec, 50°C 45 sec, 72°C 30 sec, and finally 72°C 5min. Following digestion of PCR products with *Bam*HI and *Bgl*III, ligation with *Bam*HI-digested pRS551 was performed to construct the multicopy plasmids pMT01, pMT02, and pMT03. pMT01 contains the transcriptional fusion *fooB-lacZYA*, the divergent *fooI* gene upstream of the fusion, and the entire intergenic region. pMT02 contains the transcriptional fusion *fooB-lacZYA*, a non-functional truncated *fooI* gene, and the entire intergenic region. pMT03 contained *fooB*, the intergenic region and the transcriptional *fooI-lacZYA* fusion. Each plasmid was introduced into *E. coli* MC4100 and a transformant was transfected with the lambda phage  $\lambda$ RS45, which carries homology to pRS551 as described by (Simons *et al.*, 1987). Phages  $\lambda$ 01,  $\lambda$ 02, and  $\lambda$ 03 were obtained from the respective recombination of  $\lambda$ RS45 with pMT01 pMT02, and pMT03.  $\lambda$ 01,  $\lambda$ 02, and  $\lambda$ 03 lysates were used to infect MC4100 and DL844; kanamycin-resistant lysogens (MC4100. $\lambda$ 01, DL844. $\lambda$ 01, MC4100. $\lambda$ 02, DL844. $\lambda$ 02, MC4100. $\lambda$ 03, and DL844. $\lambda$ 03) were isolated as described by (Miller, 1972). The terminase test (Blyn *et al.*, 1990) and the PCR assay described by (Powell *et al.*, 1994) were used to verify that all strains contained only one copy of phage DNA.

#### 1.3.4. $\beta$ -galactosidase activity assay.

A single bacterial colony was used to inoculate an overnight culture in M9 glycerol medium. This culture was diluted 50-fold, grown to an OD<sub>600</sub> of 0.5-0.8 in M9 glycerol medium supplemented with amino acids or with a modified pH or osmolarity as indicated. When indicated, glucose replaced glycerol as carbon source. Cultures were assayed for  $\beta$ -galactosidase activity as described (Miller, 1972). For strains showing phase variation, blue and white colonies were picked from M9-glycerol plates as starting material for assays of

$\beta$ -galactosidase activity of ON and OFF cultures, respectively. Each experiment was done in duplicate at least three times.

### **1.3.5. Calculation of the phase transition frequency.**

Strains were inoculated onto X-Gal M9 agar plates or LB plates. Colonies showing a uniform phenotype (dark blue or white, with no sectors) were resuspended in M9 salts. Appropriate dilutions were spread onto the same medium as the parent colony. After growth, the colonies were scored for a white or blue phenotype. The switch frequencies were calculated using the formula  $(M/N)/g$ , where M is the number of cells that underwent phase transition, N the total number of cells evaluated, and g the number of generations, estimated to be 27, that gave rise to the colony.

### **1.3.6. Statistical analysis.**

Statistical analysis of the results was performed using the Glm procedure of the SAS statistical package (v 6.12). Analysis of variance, the Dunnett test, and the Student-Newman-Keuls test were used to compare  $\beta$ -galactosidase activities in the different growth media. Statistical significance was declared at  $P < 0.05$ . Sigmaplot 2000 (SSPS inc.) was used to produce graphs.

## **1.4. Results.**

### **1.4.1. Regulation of *fooB* and *fooI* transcription.**

In the absence of FooI and Lrp, no phase variation occurred in the strain harbouring the *fooB-lacZYA* fusion (DL844. $\lambda$ 02) and the *fooBA* promoter was inactive (Table 2). When

FooI was present in the Lrp-negative background (DL844.λ01), the promoter was still inactive, indicating that FooI by itself is not an activator of the *foo* basal transcription. In contrast, when Lrp was present in the FooI negative background (MC4100.λ02), transcription could occur although no phase variation was observed (table 2). Therefore Lrp activated *foo* expression independently of FooI.

Phase variation occurred only in the simultaneous presence of Lrp and FooI (MC4100.λ01), leading to a majority of colonies in the ON phase, using either ON or OFF inoculating colonies (Table 2). A high increase in  $\beta$ -galactosidase activity could be observed in these phase variable cells (1231 MU in OFF-cells and 1525 MU in ON-cells compared to 213 MU in uniform cells for MC4100.λ02). This observation indicated that FooI acted in conjunction with Lrp not only to promote phase variation but also to activate basal *foo* transcription.

The *fooI* gene is also phase variable as demonstrated by the appearance of ON and OFF cells in the strain harbouring the *fooI-lacZYA* fusion (MC4100.λ03). Absence of transcriptional activity and of phase variation in the isogenic Lrp negative strain (DL844.λ03) indicated that Lrp is an activator of the *fooI* promoter and is required for phase variation.  $\beta$ -galactosidase activities from MC4100.λ03 ON and OFF colonies compared to MC4100.λ01 ON and OFF colonies showed that activity of the *fooI* promoter was weaker than activity of the *fooBA* promoter (Table 2). Furthermore, *fooI* phase variation lead to a fewer percentage of ON colonies than *fooBA* phase variation, whatever the phase of the inoculating colony. This data correlated with a slightly higher ON to OFF and a slightly lower OFF to ON switch frequency for MC4100.λ03 compared to MC4100.λ01.

#### **1.4.2. Environmental regulation of *clp* and *foo* expression.**

Expression of a number of fimbriae is regulated by environmental factors that mimic the conditions found in the host compartments. To investigate the environmental cues that modulate *clp* and *foo* expression, we monitored the activity of the *clp* and *foo* promoters in exponential cultures grown in different media. In order to distinguish the

effects exerted by the environmental factors either on the steady-state expression (i.e. the basal transcription) or on the phase variation, we used the recombinant strains expressing or not the PapI homologue.

#### **1.4.2.1. Effect of environmental factors on the *clp* and *foo* steady-state expression.**

The basal transcription level of both operons observed in M9 minimal medium supplemented with glycerol as carbon source varied very slightly with pH and osmolarity (Fig. 2). However, activity of the *foo* promoter was significantly increased at pH 5.8 and reduced at pH 7.9, whereas activity of the *clp* promoter was only increased at pH 5.8. Basal transcription of both operons was repressed at 20°C, in M9 when glucose was used in place of glycerol, and in the rich LB medium (Fig. 2). The repressive effect of glucose was in part (*clp*) or totally (*foo*) relieved by addition of cAMP to the growth medium. However, no consensus sequence for CAP binding sites (Barber *et al.*, 1993; Kolb *et al.*, 1993) was found upstream of the *clp* promoter, whereas a potential CAP binding site exists upstream of the *foo* promoter (Daigle *et al.*, 2000; Ramseier *et al.*, 1995).

We have already shown that L-leucine represses *foo* and *clp* transcription. The later is also repressed by L-alanine (Daigle *et al.*, 2000; Martin, 1996). To analyze whether other amino acids repressed *clp* and *foo* transcription, MC4100.λ6 and MC4100.λ02 were grown in M9-glycerol medium supplemented with 5 mM of some amino acids, and β-galactosidase activity was measured. It appeared that 12 out of the 14 amino acids tested repressed *clp* transcription, although, except for methionine, to a lesser extent than leucine and alanine (data not shown). Five amino acids (alanine, methionine, leucine, threonine, and histidine) individually decreased *clp* expression to 60% or less of its level in M9-glycerol medium (Fig. 3). MC4100.λ02 was grown in the presence of each of them and in the presence of aspartate which had only a weak effect on *clp* expression. Only alanine and leucine highly repressed *foo* expression whereas, surprisingly, threonine activated *foo* transcription (Fig. 3). In order to investigate if Lrp mediated the repressive effect of amino acids, we repeated the experiments on the respective isogenic Lrp mutants. We tested those six amino acids that exerted the higher *clp* repression in MC4100.λ6 in an Lrp-

background. Although  $\beta$ -galactosidase activity was higher in the Lrp<sup>-</sup> background due to the absence of Lrp repression, these amino acids, including leucine and alanine, also repressed *clp* transcription to the same extent as in the Lrp<sup>-</sup> background (Fig. 3). As in DL844. $\lambda$ 01 (FooI<sup>+</sup>, Lrp<sup>-</sup>) and DL844. $\lambda$ 02 (FooI<sup>-</sup>, Lrp<sup>-</sup>) the *foo* promoter was totally inactive due to the absence of Lrp, we could not determine whether Lrp mediated the amino acid repression of *foo* expression.

#### 1.4.2.2. Effect of environmental factors on *clp* and *foo* phase variation.

Data presented above showed that a number of environmental stimuli acted as negative regulators of *clp* and *foo* steady-state transcription in the absence of phase variation. Their effect on i) the switch frequency, and ii) the promoter activity was then assessed on cells producing the PapI homologue. Results are summarized in table 3. It was observed that glucose decreased 2-fold the *clp* OFF to ON switch frequency without altering the ON to OFF one, resulting in a lower portion of cells switching towards the ON phase. In contrast, glucose slightly increased the *foo* ON to OFF switch frequency without altering the OFF to ON one, leading to a greater proportion of cells switching towards the OFF phase. In both cases the net result was a greater percentage of cells in the OFF phase in a colony growing on glucose compared to a colony growing on glycerol.

When grown in LB or in the presence of alanine, the cells presented a uniform white or light blue phenotype, indicating that phase variation did not longer occur. The other amino acids tested, including leucine, as well as osmolarity and pH did not alter the switch frequency of phase variation (not shown). At low temperature (20°C), both operons were highly repressed, but the *clpB-lacZ* harboring cells presented a uniform white phenotype, whereas phase variation still occurred with the *fooB-lacZ* fusion. However, the ON to OFF switch frequency increased ten fold and the OFF to ON one decreased two fold, leading to only about 37% of cells in the ON phase, instead of 94% at 37°C. More cells in ON phase are obtained from an OFF colony than an ON colony. However, the  $\beta$ -galactosidase measurement of colonies revealed a higher expression in ON cells of ON colonies than in ON cells of OFF colonies (data not shown).

The promoter activity in ON and OFF colonies in the different growth conditions was assessed by measuring  $\beta$ -galactosidase activities. High osmolarity, pH 5.8, and methionine had no significant effect (data not shown). Results presented in table 3 show that leucine repressed about two fold *clp* and *foo* expression in ON and OFF cells. Alanine repressed *foo* and *clp* transcription much more than leucine, inhibiting phase variation. LB medium inhibited phase variation of both operons and repressed *foo* transcription.  $\beta$ -galactosidase activities monitored by the *clp* promoter were closer to those found in ON cells grown in M9-glycerol than to those found in OFF cells, indicating a low repressive effect, whereas the *foo* promoter was highly repressed. The effect of glucose on the promoter activity of *clp* and *foo* was not similar. Glucose dramatically repressed *clp* transcription in ON cells. Since the large majority of cells were OFF even in an ON colony due to the low frequency of the OFF to ON switch,  $\beta$ -galactosidase activity after culture of an ON colony in liquid M9-glucose was representative of mainly OFF cells. The low  $\beta$ -galactosidase activity found also indicated that the promoter was poorly active even in ON cells. Repression by glucose was not relieved upon addition of cAMP, in accordance with the absence of a consensus CAP binding site in the *clp* regulatory region. In contrast, glucose repressed *foo* expression in ON and OFF colonies, but  $\beta$ -galactosidase activities remained relatively high. This repression was relieved by cAMP, in agreement with the presence of consensus CAP binding sites in the *foo* regulatory region (Table 3). Low temperature repressed *clp* and *foo* transcription, and this effect was more drastic for *foo*.

### 1.5. Discussion.

F165<sub>I</sub>, encoded by the *foo* operon, belongs to the P-regulatory family of fimbriae. As other members of this family, *foo* expression is submitted to a tight control at the transcriptional level, mediated by the global regulator Lrp and a specific regulator homologous to PapI, FooI. In the absence of these two regulators, the *foo* promoter is completely inactive. Lrp but not FooI is required to activate the basal transcription. However, Lrp and FooI are required simultaneously to promote phase variation, allowing maximal *foo* transcription in most cells (phase-ON cells) whereas the promoter is inactive in the remaining cells (phase-OFF cells). Phase-ON cells are largely predominant in the

bacterial population, as it was previously found for *pap-21* (Blyn *et al.*, 1989). But this is in contrast with observations made on other P-related operons, as *clp* and *pap-17*, where a large majority of cells are in the OFF-phase (Low *et al.*, 1996; Martin, 1996). The molecular basis for this difference is not known but could be due to amino acid changes in the PapI homologue, to nucleotide changes in the regulatory region, or to other regulators not yet identified. The *fooI* promoter is weaker than the *foo* promoter, and expression of the *fooI* gene is also controlled by phase variation, leading to a large number of phase-ON cells. However, the *fooI* and *fooBA* operons show different transition frequencies, leading to less colonies expressing *fooI* than *fooBA*. These results suggest that FooI is produced in lower amounts than the fimbrial proteins, and that a low level of FooI in the cell is sufficient to control *foo* expression.

A number of *E. coli* fimbrial operons are known to respond to environmental stimuli (Krabbe *et al.*, 2000), and it is well accepted that the variety of response observed probably reflects the ecological niches which are colonized by bacteria producing these fimbriae. CS31A and F165<sub>1</sub> are produced by septicemic and diarrheic *E. coli* (Fairbrother *et al.*, 1986; Girardeau *et al.*, 1988). Both CS31A and F165<sub>1</sub> producing bacteria persist in the intestine, when CS31A producing strains are found in kidneys and urine and F165<sub>1</sub> producing strain are found in the lungs and liver in the systemic phase of the disease (Der Vartanian *et al.*, 1992; Ngeleka *et al.*, 1993). CS31A and F165.1 were shown to be produced in the gut but in vivo expression of *clp* and *foo* in other host compartments has never been investigated. Here we analyzed the effect of different environmental cues on the *clp* and *foo* expression. We used a range of pH and osmolarity values that overlap the normal range of values encountered in intestine content, blood and urine (Diem et Lentner, 1972; Evans *et al.*, 1988; Ferraris *et al.*, 1990). We observed a slight increase in *clp* and *foo* expression at moderately acidic pH (5.8) and high osmolarity, with no effect on phase variation. Nevertheless, expression of both operons remained high in the range of pH (5.8 to 7.9) and osmolarity (215 to 600 mosM) tested except for *foo* at pH 7.9 where a weak decrease was observed. Expression of both operons was repressed in rich LB medium and in the presence of glucose and of some amino acids. LB medium, glucose and alanine operate at two levels by reducing or preventing the OFF to ON switch and by repressing the basal transcription, while some other amino acids, including leucine, repressed the basal transcription without altering the phase variation. Growth of cells in glucose also inhibits *pap* expression by reducing the OFF to ON switch frequency (Blyn *et al.*, 1989). The

precise molecular mechanism is not known, but it was shown that CAP binding in the regulatory region is required for activation of the *papBA* promoter (Weyand *et al.*, 2001). Glucose could influence *pap* expression due to a lowered cAMP level, which reduces the PapB and thus the PapI level, since PapB activates *papI* transcription (Göransson *et al.*, 1989a). Addition of cAMP to M9-glucose relieves the glucose catabolic repression of the *foo* operon. The regulatory region of *foo* contains a CAP binding site identical to the CAP site described for *pap* and localized at the same position relative to the promoter (Daigle *et al.*, 2000). Thus CAP highly probably activates *foo* expression. In contrast, no CAP binding site has been found in the *clp* regulatory region, and the mechanism of the catabolite repression is not known for this operon.

Among fimbriae belonging to the P-regulatory family, only CS31A and F165<sub>I</sub> have been shown to respond to leucine and alanine levels (Crosthwaite *et al.*, 2003; Daigle *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2000; Martin, 1996). Synthesis of K99 and type1 fimbriae is also sensitive to leucine and alanine (De Graaf *et al.*, 1980; Gally *et al.*, 1993). However, expression of these fimbriae is controlled by a mechanism involving Lrp, but is distinct from that of members of the P-regulatory family. L-alanine and L-leucine repressed both *foo* and *clp* transcription, but alanine inhibited phase variation, locking cells in phase OFF, whereas leucine had no effect on phase variation. Two mechanisms by which leucine and alanine repress *clp* transcription have been described (Crosthwaite *et al.*, 2003). The first one is a ClpB-dependent repression of the basal transcription that does not require Lrp. The second one is mediated by Lrp. Lrp binds to two GATC sites in the *clp* regulatory region (GATC<sub>dist</sub> and GATC<sub>prox</sub>) with a lower affinity for GATC<sub>dist</sub> than for GATC<sub>prox</sub>. Lrp binding to GATC<sub>prox</sub> lead to repression of *clp* expression. The PapI homologue is required for Lrp to bind GATC<sub>dist</sub>, leading to appearance of phase-ON cells. Leucine and alanine alter the affinity of Lrp for its target sites. Leucine lowers and alanine prevents Lrp binding to GATC<sub>dist</sub>, acting as antagonists of the PapI homologue. In addition, alanine increases Lrp binding to GATC<sub>prox</sub>, so that cells are locked in a highly repressed OFF phase. The mechanisms by which alanine and leucine repress *foo* expression are not known. Characterization of these mechanisms will be of great interest since leucine and alanine that exert similar repression on both operons are Lrp antagonists in the case of *clp*, and Lrp agonists in the case of *foo*. The Lrp-independent mechanism does not seem to mediate alanine and leucine repression of *foo* because no repression was observed in strains containing an Lrp mutant protein that



could no longer respond to leucine (Berthiaume *et al.* submitted). Influence of leucine and alanine on Lrp binding to the *foo* regulatory region is currently under investigation.

Temperature below 30°C is known to repress expression of a number of virulence factors, including fimbriae (Harel et Martin, 1999). At 20°C, *clp* and *foo* expression was highly repressed. Cells expressing the *clp-lacZYA* fusion were locked in the OFF-phase, whereas in the bacterial population expressing the *foo-lacZYA* fusion the number of phase-ON cells decreased dramatically compared to 37°C. Low temperatures also abolish *pap* phase variation, locking cells in the OFF-phase. This thermoregulation is dependent on H-NS and independent of PapI and PapB (White-Ziegler *et al.*, 1998). Involvement of H-NS on F165<sub>I</sub> and CS31A thermoregulation was not investigated in this study.

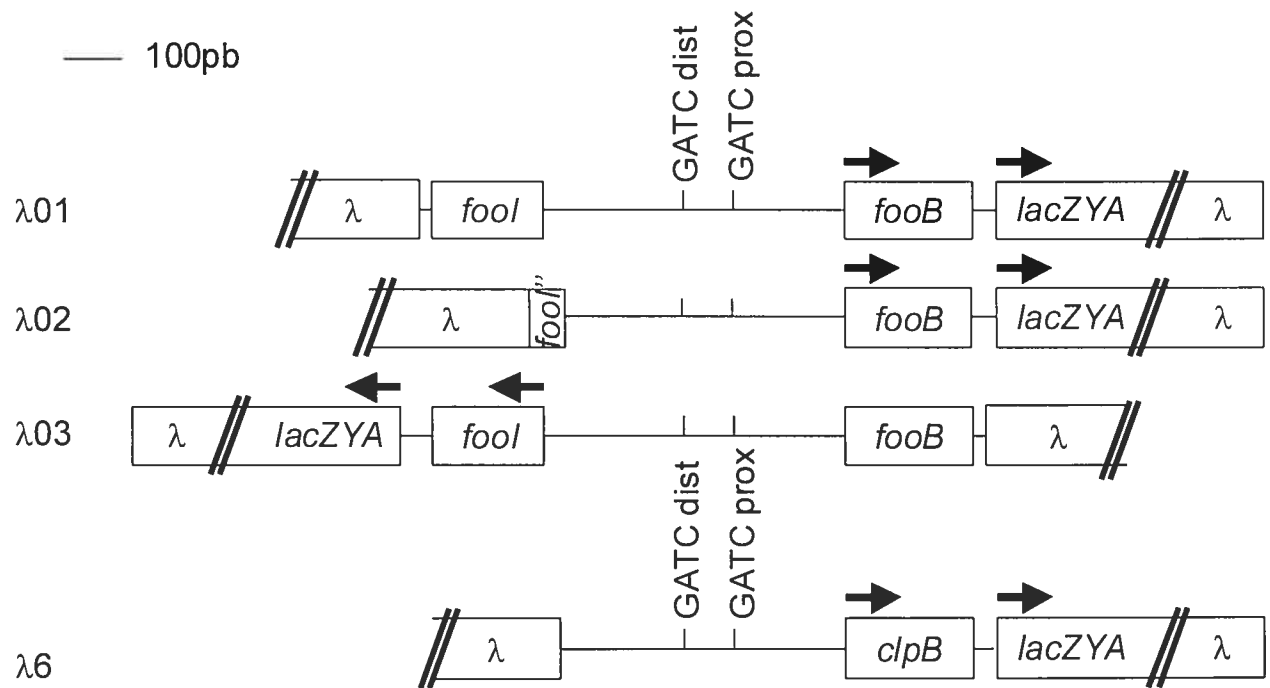
In conclusion, the regulation pattern of the *foo* and *clp* operons would be consistent with F165<sub>I</sub> and CS31A production in low nutrient environments, even at moderately acidic pH or high osmolarity, such as the distal part of the intestine or the urine, organs as kidneys or spleen, but not in the blood due to the presence of glucose and amino acids. This is consistent with the role attributed to these adhesins. Production of CS31A and F165.1 in the intestine and the organs infected during the septicemic phase would help to colonize the tissues and to resist to the phagocytic activities of macrophages and PMNs attracted to the site of the infection. Since presence in growth medium of alanine and leucine induces repression of *clp* and *foo* expression, those amino acids appear to be interesting agents which could be used in order to prevent infections by those septicemic *E. coli* strains.

## 1.6.Acknowledgements.

We grateful to Marie-Claude Champagne for technical assistance. This work was supported in part by le département de santé animale de l'Institut National de Recherche Agronomique, and by a grant (Grant OGP0025120) to J.H. from the natural Sciences and Engineering research Council of Canada and grant 0214 from the Formation de Chercheurs et Aide à la Recherche.

<i>E. coli</i> strains, Plasmids, or Bacteriophage	Description	Reference
<i>E. coli</i> MC4100 DL844	F <sup>-</sup> ara D139 Δ( <i>lac</i> IPOZYA-arg F)U169 <i>rps</i> L <i>thi</i> -1 MC4100 <i>mbf</i> -20 F <sup>-</sup> <i>mcr</i> A Δ( <i>mrr</i> - <i>hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) φ80/ <i>lac</i> ZΔM15 Δ/ <i>lac</i> X74 <i>deo</i> R <i>rec</i> A1 <i>ara</i> D139 Δ( <i>ara</i> - <i>leu</i> )7697 <i>gal</i> U <i>gal</i> K	Casadaban (1976) Braaten <i>et al.</i> (1994)
Top10	<i>rps</i> L(Str <sup>R</sup> ) <i>end</i> A1 <i>nup</i> G <i>rec</i> A1 <i>end</i> A1 <i>gyr</i> A96 <i>thi</i> -1 <i>hsd</i> R17 <i>sup</i> E44 <i>rel</i> A1 <i>lac</i> (F' <i>pro</i> AB <i>lac</i> I <sup>q</sup> Z Δ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> ))	Grant <i>et al.</i> (1990)
XL1 blue	MC4100-λ01( <i>foo</i> B- <i>lac</i> ZYA)	Stratagene
MC4100.λ01	MC4100-λ02 ( <i>foo</i> I negative <i>foo</i> B- <i>lac</i> ZYA)	this study
MC4100.λ02	MC4100-λ03 ( <i>foo</i> I- <i>lac</i> ZYA)	this study
MC4100.λ03	DL844-λ01 ( <i>lrp</i> negative <i>foo</i> B- <i>lac</i> ZYA)	this study
DL844.λ01	DL844-λ02 ( <i>lrp</i> negative <i>foo</i> I negative <i>foo</i> B- <i>lac</i> ZYA)	this study
DL844.λ02	DL844-λ03 ( <i>lrp</i> negative <i>foo</i> I- <i>lac</i> ZYA)	this study
DL844.λ03	MC4100-λ6 ( <i>clp</i> B- <i>lac</i> ZYA)	Martin 1996
MC4100.λ6	MC4100-λ6-ptrf1 ( <i>afa</i> F positive <i>clp</i> B- <i>lac</i> ZYA)	Martin 1996
MC4100.λ6(ptrf1)		
Plasmids		
pRS551	<i>amp</i> - <i>kan</i> - <i>lac</i> ZYA pMB1 replicon	Simons <i>et al.</i> (1987)
pGEM-T		Promega
ptrf1	ptrc99A- <i>afa</i> F	Martin 1996
Bacteriophage		
λRS45	<i>amp</i> '- <i>lac</i> ZYA <i>imm</i> <sup>21</sup>	Simons <i>et al.</i> (1987)
λ01	λRS45-pMT01 recombinant phage	this study
λ02	λRS45-pMT02 recombinant phage	this study
λ03	λRS45-pMT03 recombinant phage	this study
λ6	λRS45-pPG6	Martin 1996

**Table 1:** Strain, plasmids and bacteriophages description.

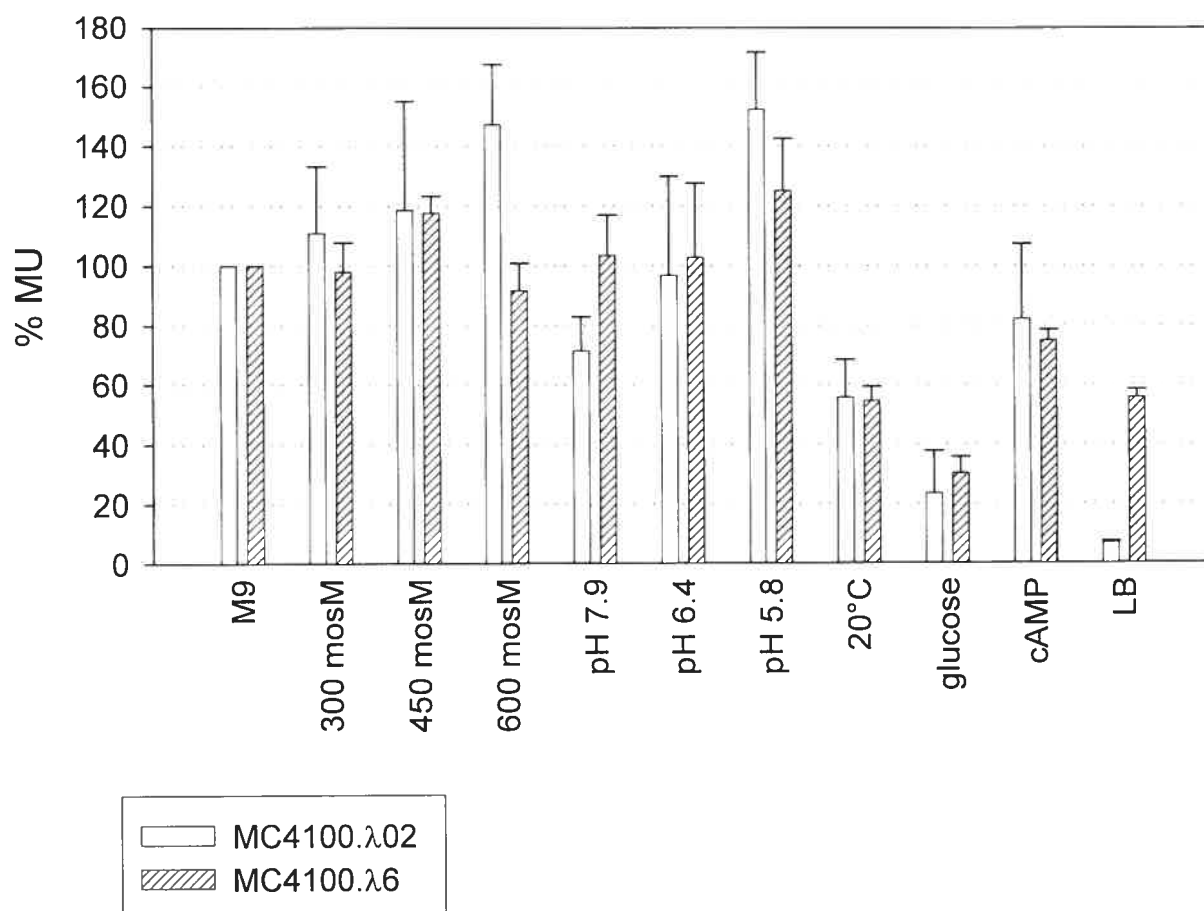


**Fig. 1 :** Physical maps of single-copy *fooB-lacZ*, *fooI-lacZ* and *clpB-lacZ* fusions. Open boxes indicate the positions of genes and  $\lambda$  sequences. GATC sites distal (dist) and proximal (prox) are shown.

Strain type	Genotype	Growth Medium	Starting colony phenotype	Switch frequency		$\beta$ -gal activity per colony <sup>a</sup>	% of Lac+ colony
				ON to OFF	OFF to ON		
MC4100. $\lambda$ 01	<i>fooB-lacZ</i>	M9-glycerol	ON	$2.1 \times 10^{-3}$	$3.58 \times 10^{-2}$	1525 $\pm$ 714	94
	Lrp+ Fool+		OFF			1230 $\pm$ 300	88
DL844. $\lambda$ 01	<i>fooB-lacZ</i> Lrp- Fool+	M9-glycerol	uniform	-	-	18 $\pm$ 1	-
MC4100. $\lambda$ 02	<i>fooB-lacZ</i> Lrp+ Fool-	M9-glycerol	uniform	-	-	213 $\pm$ 17	-
DL844. $\lambda$ 02	<i>fooB-lacZ</i> Lrp- Fool-	M9-glycerol	uniform	-	-	18 $\pm$ 1	-
MC4100. $\lambda$ 03	<i>fooI-lacZ</i>	M9-glycerol	ON	$6 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^{-2}$	146 $\pm$ 16	85
	Lrp+ Fool+		OFF			77 $\pm$ 12	42
DL844. $\lambda$ 03	<i>fooI-lacZ</i> Lrp- Fool+	M9-glycerol	uniform	-	-	21 $\pm$ 1	-
MC4100. $\lambda$ RS551 <sup>b</sup>	negative control	M9-glycerol	uniform	-	-	8 $\pm$ 1	-
DL844. $\lambda$ RS551 <sup>b</sup>	negative control	M9-glycerol	uniform	-	-	9 $\pm$ 1	-

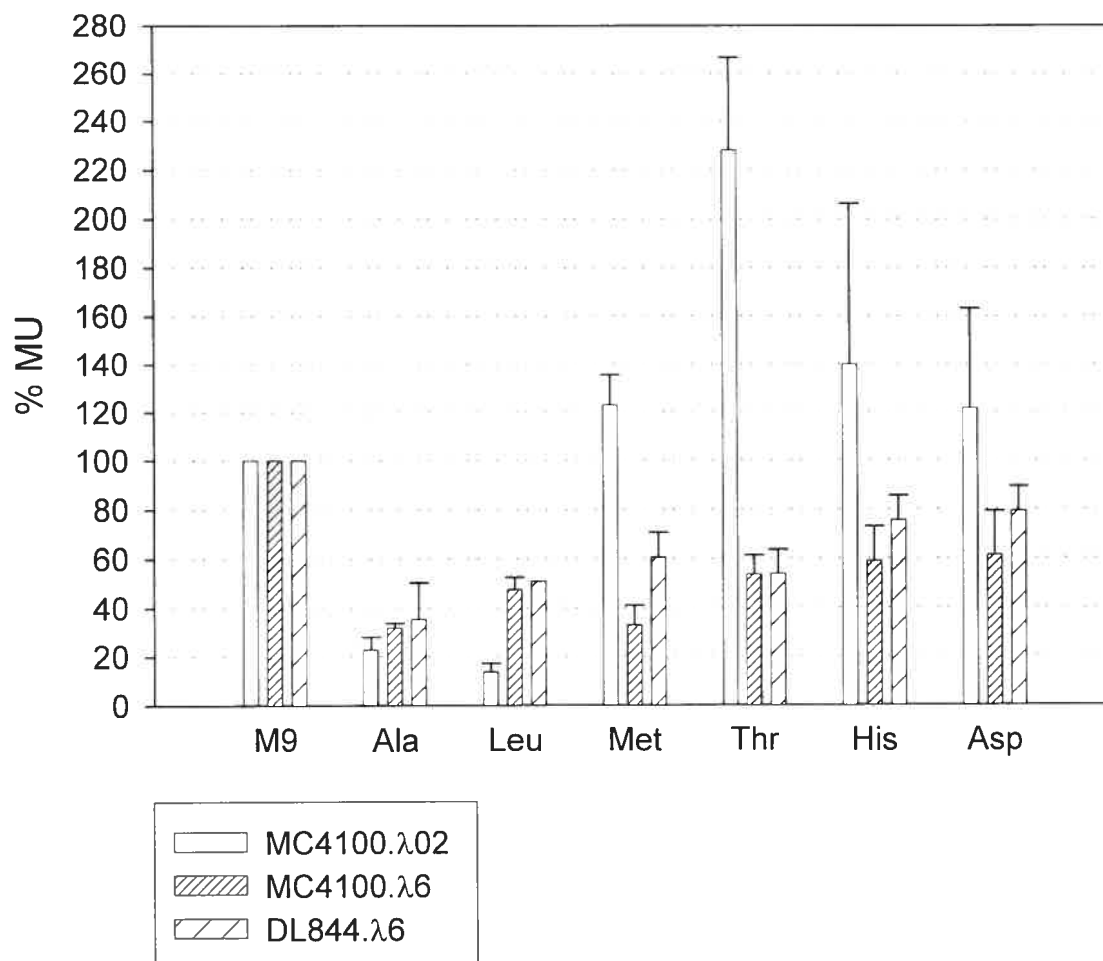
**Table 2** : Phase variation phenotype, switch frequencies and  $\beta$ -galactosidase activity of *fooB* and *fooI* promoters.

<sup>a</sup> expressed in Miller units. <sup>b</sup> Lambda lysogen strains carrying recombinant DNA sequence of pRS551.



**Fig. 2** : Effect of environmental factors on the *foo* and *clp* promoters activity in MC4100.λ02 and MC4100.λ6.

Promoter activity of bacteria grown in M9-glycerol medium, 37°C, 215 mosm/L, pH 7.0 was considered as 100 %. MU Miller units.



**Fig. 3** : Effect of individual amino acids on *fooB-lacZ* and *clpB-lacZ* activity in strains MC4100.λ02 (Lrp<sup>+</sup>, FooI<sup>-</sup>), MC4100.λ6 (Lrp<sup>+</sup>, AfaF<sup>-</sup>) and DL844.λ6 (Lrp<sup>-</sup>, AfaF<sup>-</sup>).

β-galactosidase activity in the controls (M9-glycerol medium, 37°C) without amino acid was considered as 100 %. Each amino-acid was added to M9 medium to 5 mM. MU Miller units.

Growth Medium	strain type	Starting colony phenotype	Switch frequency		$\beta$ -gal activity <sup>a</sup>	% of Lac+ colony
			ON to OFF	OFF to ON		
M9-glycerol	MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1)	ON	$3.16 \times 10^{-2}$		$87 \pm 21$	21
		OFF		$1.47 \times 10^{-3}$	$18 \pm 5$	4
	MC4100. $\lambda$ 01	ON	$2.1 \times 10^{-3}$		$1525 \pm 714$	94
		OFF		$3.58 \times 10^{-2}$	$1231 \pm 300$	88
M9-glycerol + leucine	MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1)	ON	$3.24 \times 10^{-2}$		$47 \pm 28$	19
		OFF		$1.81 \times 10^{-3}$	$8 \pm 3$	4
	MC4100. $\lambda$ 01	ON	$1.05 \times 10^{-3}$		$723 \pm 278$	97
		OFF		$3.91 \times 10^{-2}$	$505 \pm 102$	96
M9-glycerol + alanine	MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1)	uniform	-	-	$10 \pm 3$	-
	MC4100. $\lambda$ 01	uniform	-	-	$111 \pm 64$	-
M9-glucose	MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1)	ON	$3.7 \times 10^{-2}$		$11 \pm 4$	7
		OFF		$7.2 \times 10^{-4}$	ND	2
	MC4100. $\lambda$ 01	ON	$4 \times 10^{-3}$		$1060 \pm 610$	89
		OFF		$2.49 \times 10^{-2}$	$425 \pm 69$	67
M9-glucose-cAMP	MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1)	ON	ND		$17 \pm 7$	ND
		OFF		ND	ND	ND
	MC4100. $\lambda$ 01	ON	ND		$1141 \pm 211$	95
		OFF		ND	$861 \pm 159$	88
M9-20°C	MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1)	uniform	-	-	$35 \pm 9$	-
	MC4100. $\lambda$ 01	ON	$2.5 \times 10^{-2}$		$191 \pm 34$	37
		OFF		$1.8 \times 10^{-2}$	$234 \pm 54$	52
LB	MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1)	uniform	-	-	$50 \pm 16$	-
	MC4100. $\lambda$ 01	uniform	-	-	$63 \pm 21$	-

**Table 3** : Effect of different environmental cues on the *clp* and *foo* promoters activity.

Phase variation phenotype, switch frequencies and  $\beta$ -galactosidase activity of all strains studied in each culture medium tested. <sup>a</sup> expressed in Miller units. Results of phase variation phenotype, switch frequencies and  $\beta$ -galactosidase activity of strain MC4100. $\lambda$ 6 grown in M9, M9 + leucine and M9 + alanine were already published in Crost *et al.* 2003.

## 1.7. References.

- Båga, M., Göransson, M., Normark, S., and Uhlin, B.E. (1985) Transcriptional activation of a *pap* pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO journal* **4**: 3887-3893.
- Barber, A.M., Zhurkin, V.B., and Adhya, S. (1993) CRP-binding sites: evidence for two structural classes with 6-bp and 8-bp spacers. *Gene* **130**: 1-8.
- Blyn, L.B., Braaten, B.A., White-Ziegler, C.A., Rolfson, D.H., and Low, D.A. (1989) Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional regulation. *EMBO Journal* **8**: 613-620.
- Blyn, L.B., Braaten, B.A., and Low, D.A. (1990) Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential *dam* methylation states. *EMBO Journal* **9**: 4045-4054.
- Braaten, B.A., Platko, J.V., van der Woude, M.W., Simons, B.H., de Graaf, F.K., Calvo, J.M., and Low, D.A. (1992) Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the *pap* and *fan* pili operons in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**: 4250-4254.
- Braaten, B.A., Nou, X., Kaltenbach, L.S., and Low, D.A. (1994) Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**: 577-588.
- Casadaban (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage Lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology* **104**: 541-555.
- Crost, C., Garrivier, A., Harel, J., and Martin, C. (2003) Leucine-responsive regulatory protein-mediated repression of *clp* (encoding CS31A) expression by L-leucine and L-alanine in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **185**: 1886-1894.
- Daigle, F., Forget, C., Martin, C., Drolet, M., Tessier, M.C., Dezfoulian, H., and Harel, J. (2000) Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Research in Microbiology* **151**: 1-12.
- De Graaf, F.K., Klaasen, P., and van Hees, J.E. (1980) Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. *Infection and Immunity* **30**: 125-128.



- Der Vartanian, M., Jaffeux, B., Contrepois, M., Chavarot, M., Girardeau, J.-P., Bertin, Y., and Martin, C. (1992) Role of aerobactin in systemic spread of an opportunistic strain of *Escherichia coli* from the intestinal tract of gnotobiotic lambs. *Infection and Immunity* **60**: 2800-2807.
- Di Martino, P., Bertin, Y., Girardeau, J., Livrelli, V., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1995) Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and Immunity* **63**: 4336-4344.
- Diem, K., and Lentner, C. (1972) *Tables scientifiques*. Bâle, Suisse.
- Evans, D.F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A.G., and Dyson, T.J. (1988) Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* **29**: 1035-1041.
- Fairbrother, J.M., Larivière, S., and Lallier, R. (1986) New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. *Infection and Immunity* **51**: 10-15.
- Ferraris, R.P., Yasharpour, S., Llyod, K.C., Mirzayan, R., and Diamond, J.M. (1990) Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *American Journal of Physiology* **259**: G822-837.
- Gally, D.L., Bogan, J.A., Eisenstein, B.I., and Blomfield, I.C. (1993) Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *Journal of Bacteriology* **175**: 6186-6193.
- Girardeau, J., Der Vartanian, M., Ollier, J., and Contrepois, M. (1988) CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity* **56**: 2180-2188.
- Göransson, M., Forsman, K., Nilsson, P., and Uhlin, B.E. (1989) Upstream activation sequences that are shared by two divergently transcribed operons mediate cAMP-CRP regulation of pilus-adhesin in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **3**: 1557-1565.
- Harel, J., and Martin, C. (1999) Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Research* **30**: 131-155.
- Harel, J., Daigle, F., Forget, C., Tessier, M.C., Crost, C., and Martin, C. (2000) Phase variation of F165(1) (Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicemia in animals. *Canadian Journal of Microbiology* **46**: 1101-1107.

- Henderson, I.R., Owen, P., and Nataro, J.P. (1999) Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation (MicroReview). *Molecular Microbiology* **33**: 919-932.
- Jallat, C., Darfeuille-Michaud, A., Girardeau, J., Rich, C., and Joly, B. (1994) Self-transmissible R plasmids encoding CS31A among human *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal stools. *Infection and Immunity* **62**: 2865-2873.
- Kolb, A., Igarashi, K., Ishihama, A., Lavigne, M., Buckle, M., and Buc, H. (1993) *E. coli* RNA polymerase, deleted in C-terminal part of its alpha-subunit, interacts differently with the cAMP-CRP complex at the *lacP1* and at the *galP1* promoter. *Nucleic Acids Research* **21**: 319-326.
- Krabbe, M., Weyand, N., and Low, D. (2000) Environmental control of pilus gene expression. In *Bacterial stress responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis (eds). Washington, DC, USA: ASM Press, pp. 305-321.
- Low, D.A., Braaten, B., and Van Der Woude, M. (1996) Fimbriae. In *Escherichia coli and Salmonella*. Vol. 1. Curtiss III R., I.J.L., Lin E. C. C., Low K. B., Magasanik B., Reznikoff W. S., Riley M., Schaechter M., Umbrager H. E. (ed). Washington DC.: American Society for Microbiology, pp. 146-157.
- Martin, C. (1996) The *clp* (CS31A) operon is negatively controlled by Lrp, ClpB, and L-alanine at the transcriptional level. *Molecular Microbiology* **21**: 281-292.
- Miller, J.F. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press,.
- Ngeleka, M., Jacques, M., Martineau-Doizé, B., Daigle, F., Harel, J., and Fairbrother, J.M. (1993) Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165<sub>1</sub> fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. *Infection and Immunity* **61**: 836-843.
- Ngeleka, M., Martineau-Doizé, B., and Fairbrother, J.M. (1994) Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K"V165" F165<sub>1</sub> resists killing by porcine polymorphonuclear leukocytes in vitro: role of F165<sub>1</sub> fimbriae and K"V165" O-antigen capsule. *Infection and Immunity* **62**: 398-404.
- Ngeleka, M., and Fairbrother, J.M. (1999) F165(1) fimbriae of the P fimbrial family inhibits the oxidative response of porcine neutrophils. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **25**: 265-274.
- Nou, X., Skinner, B., Braaten, B., Blyn, L., Hirsch, D., and Low, D. (1993) Regulation of pyelonephritis-associated pili phase-variation in *Escherichia coli*: binding of the

- PapI and the Lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation. *Molecular Microbiology* **7**: 545-553.
- Nou, X., Braaten, B., Kaltenbach, L., and Low, D.A. (1995) Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. *EMBO journal* **14**: 5785-5797.
- Powell, B., Rivas, M.P., Court, D.L., Nakamura, Y., and Turnbough, J. (1994) Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Research* **22**: 5765-5766.
- Ramseier, T.M., Bledig, S., Michotey, V., Feghali, R., and Saier, M.H.J. (1995) The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **16**: 1157-1169.
- Simons, R.W., Houman, F., and Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96.
- Weyand, N.J., Braaten, B.A., Van Der Woude, M., Tucker, J., and Low, D.A. (2001) The essential role of the promoter-proximal subunit of CAP in *pap* phase variation: Lrp- and helical phase-dependent activation of *papBA* transcription by CAP from -215. *Molecular Microbiology* **39**: 1504-1522.
- White-Ziegler, C.A., Angus Hill, M.L., Braaten, B.A., van der Woude, M.W., and Low, D.A. (1998) Thermoregulation of *Escherichia coli pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Molecular Microbiology* **28**: 1121-1137.

### **Implication de l'auteur dans cet article.**

En tant que premier auteur de cet article, j'ai réalisé les expériences de dosages de la  $\beta$ -galactosidase pour l'opéron *clp* à l'exception des souches AfaF+. Les courbes de croissances des souches MC4100. $\lambda$ 06, MC4100. $\lambda$ 15, qui ont permis de déterminer le niveau de croissance bactérienne où l'expression de *clp* est maximale, ont été réalisées par le premier auteur. Une partie du séquençage du plasmide p31A a été effectuée par le premier auteur. Le premier auteur a aussi analysé les résultats et participé à la rédaction de cet article ainsi qu'au processus de publication.

## **2. ARTICLE II : LEUCINE-RESPONSIVE REGULATORY PROTEIN-MEDIATED REPRESSION OF *clp* (ENCODING CS31A) EXPRESSION BY L-LEUCINE AND L-ALANINE IN *ESCHERICHIA COLI*.**

Cet article a été publié dans *Journal of Bacteriology*, March 2003, p. 1886-1894, Vol. 185, No. 6. Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Cécile Crost,<sup>1-2</sup> Annie Garrivier,<sup>1</sup> Josée Harel,<sup>2</sup> and Christine Martin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Microbiologie, Institut National de la Recherche Agronomique, 63122 St-Genès-Champanelle, France,

<sup>2</sup> Département de Pathologie et Microbiologie, Université de Montréal, St-Hyacinthe QC J2S 7C6, Canada

Received 16 July 2002/ Accepted 16 December 2002

### **2.1. Abstract.**

CS31A produced by septicemic and diarrheic *Escherichia coli* belongs to the Pap-regulatory family of adhesive factors, which are under methylation-dependent transcriptional regulation. Common features of operons encoding members of this family include two conserved GATC sites in the upstream regulatory region, and transcriptional regulators homologue to the PapB and PapI proteins. Methylation protection of GATC sites was previously shown to be dependent on the leucine-responsive regulatory protein (Lrp). Lrp and ClpB, the PapB equivalent, repressed *clp* basal transcription. A PapI homologue (AfaF) was required together with Lrp to establish the phase variation control, which gave rise to phase-ON cells that expressed CS31A and phase-OFF cells that did not express CS31A. In phase-OFF cells, the GATC<sub>dist</sub> site was methylated and the GATC<sub>prox</sub> site was protected from methylation, whereas in phase-ON cells, the inverse situation was found. Unlike Pap fimbriae, CS31A synthesis was dramatically reduced in media containing L-alanine or L-leucine. L-Alanine prevented the OFF-to-ON switch, locking *clp* expression in

the OFF phase, whereas L-leucine repressed transcription without obvious effect on the switch frequency of phase variation. In phase-variable cells, leucine and alanine promoted methylation of GATC<sub>dist</sub> and methylation protection of GATC<sub>prox</sub>, increasing the methylation pattern characteristic of repressed cells. Furthermore, alanine prevented the AfaF-dependent methylation protection of GATC<sub>dist</sub> and thus the appearance of phase-ON cells. In addition, analysis of *clp* expression in a Lrp-negative background indicated that alanine and leucine also repressed *clp* transcription by a methylation-independent mechanism.

## 2.2. Introduction.

Lrp (leucine-responsive regulatory protein) is a global transcriptional regulator of metabolism in *Escherichia coli*. It affects the expression of a number of operons involved in amino acid biosynthesis and degradation, nutrient transport, and formation of fimbriae. Many of these operons are also subject to control by leucine and alanine. All the possible regulatory patterns in response to Lrp and leucine have been demonstrated. Lrp positively regulates some operons and negatively regulates others. In each category, leucine antagonizes the action of Lrp on certain operons and potentiates it on other operons. Some other positively or negatively regulated operons are insensitive to leucine. In a number of cases, alanine has been shown to have a similar effect to leucine (for reviews, see references Calvo and Matthews, 1994; Newman and Lin, 1995). It has been shown that leucine antagonizes the activating action of Lrp on *ilvIH* and *gltBDF* promoters and the repressive action of Lrp on the *lysU* promoter by reducing the affinity of Lrp for its binding sites (13, 25, 37). To explain why some operons are insensitive to leucine even when the cell contains enough leucine to bind to Lrp, Ernsting *et al.* suggested that the effect of leucine on positively regulated genes depends on the effective in vivo concentration of Lrp (13). At high Lrp concentrations, Lrp binds to the promoters regardless of the presence or absence of leucine, whereas at low Lrp concentrations, the activities of these promoters is leucine sensitive. If Lrp binds to different promoters with different affinities, the target genes with the lowest affinity for Lrp are the most sensitive to leucine. However, such a model does not explain how leucine can potentiate the action of Lrp.

Regulation of expression of fimbriae belonging to the P-regulatory family involves Lrp, which directly interacts with another regulatory protein encoded by the fimbrial operons, a PapI homologue. Expression of all the operons so far studied belonging to this family is insensitive to leucine, except for the *clp* and *foo* operons encoding CS31A and F1651 fimbriae, respectively (18, 28). Fimbrial operons belonging to the P-regulatory family share important regulatory features. They are subject to phase variation control (except *fae*, encoding K88), defined as the ability of cells to switch in a reversible manner between fimbriated, phase-ON cells and afimbriated, phase-OFF cells. Lrp and a PapI homologue are required for the switch to occur (20, 26). The Lrp target regulatory region contains two GATC sites that are spaced 102 or 103 bp apart. The differential methylation status of these sequences determines the binding of Lrp, because Lrp binds only nonmethylated or hemimethylated GATC sites (34). PapI or its homologues have the capacity to displace Lrp from one binding site to another (24, 33). The activity of the promoter depends on the binding of Lrp, since Lrp activates expression when bound to certain sites and represses expression when bound to others (33, 39, 40). All operons also encode a PapB homologue that appears to play a dual role in the control of *pap* expression. Low levels of PapB activate *papI* transcription, whereas high levels suppress *papBA* expression (3, 17, 42). Distinct regulatory features can also be observed between members of the P-regulatory family. Null mutations in the *lrp* gene reduce the transcription of some operons, such as *pap*, *pef*, *sfa*, and *daa* (4, 32, 38), and increase the transcription of others, such as *clp* or *fae* (22, 23). PapI homologues activate the transcription of *pap*, *sfa*, *daa*, and *foo* (33, 38) and repress the transcription of *pef*, *fae*, and *clp* (22, 23, 32).

CS31A, encoded by the *clp* operon is produced by septicemic and enterotoxigenic bovine (9, 16) and human (23) *E. coli* strains. In *E. coli* reference strain 31A, CS31A is encoded by a high-molecular-weight plasmid called p31A. CS31A mediates adhesion to Caco-2 and Int-407 cells (12, 23), is required for full bacterial virulence in the rat model, and protects bacteria from phagocytosis by bovine polymorphonuclear neutrophils (J. P. Girardeau, personal communication). In the absence of phase variation, i.e., in the absence of a PapI homologue in the cells, Lrp and the specific regulator ClpB negatively control the basal *clp* expression. Under these conditions, GATCdist is methylated whereas GATCprox is protected from methylation. Lrp, but not ClpB, is required for methylation protection of GATCprox. Methylation is required for repression (28). Leucine and alanine dramatically

reduce CS31A production (16, 29). We have previously shown that alanine represses basal *clp* transcription twofold in the absence of a PapI homologue and inhibits phase variation in its presence (28).

In this study, CS31A phase variation was examined using AfaF, a PapI equivalent. The influence of AfaF and Lrp on the methylation patterns and their role in phase variation were investigated. The influence of leucine and alanine on *clp* expression and on the methylation pattern was examined. As emphasized by Blomfield, changes in phase variation as opposed to steady-state control could have different outcomes on fimbriae production (1a). Thus, we tried to distinguish the effect of leucine and alanine on each process by studying the steady-state expression (i.e., the basal transcription) and the phase variation in the absence and presence of AfaF.

## **2.3. Materials and methods.**

### **2.3.1. Bacterial strains and media.**

*E. coli* strains MC4100.6, MC4100.15, DL844.6, and DL844.15/1 contain a single chromosomal copy of a *clp-lacZYA* fusion (see Fig. 1). The 6 lysogens contain an entire functional *clpB* gene, whereas *clpB* is truncated in the 15 lysogens (28). DL844.15/1 was constructed as previously described to replace DL844.15 (28). The PCR assay described by Powell et al. (36) was used to verify that the four strains contained single lysogens. By this method, the DL844.15 strain used in a previous study (28) was shown to harbor more than one copy of the prophage, which was not detected by the terminase test (2) that was used previously. DL844 is an Lrp-negative isogenic MC4100 strain (5). *ptrf1* and *pCLB99* are multicopy recombinant plasmids derived from *ptrc99A* (Pharmacia Biotech) and express *afaF* and *clpB*, respectively, under the control of the *trc* promoter (28). Luria-Bertani broth, Luria-Bertani agar, M9 minimal broth, and M9 minimal agar were prepared by the method of Miller (30). Glycerol as carbon source was added at 0.2% (wt/vol). Supplements, when appropriate, were used at the following concentrations: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal), 40  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG), 1



mM; L-leucine or L-alanine, 5 mM; ampicillin, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; and kanamycin, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Isoleucine (0.4 mM) and valine (0.6 mM) were added to media containing 5 mM leucine. Cultures of strains harboring *ptrf1* were done without IPTG to avoid too high an expression of *afaF*.

### **2.3.2. Assay of $\beta$ -galactosidase activity.**

A single bacterial colony picked on M9-glycerol agar plates containing X-Gal was used to inoculate an overnight culture in M9-glycerol medium. This culture was diluted 50-fold, grown to logarithmic phase (optical density at 600 nm, 0.5 to 0.8) in M9-glycerol medium supplemented with amino acids as indicated. Cultures were assayed for  $\beta$ -galactosidase activity as described previously (30). For strains showing phase variation, ON (blue) or OFF (white) colonies were picked from M9-glycerol-X-Gal plates as starting material for assays of activity of ON and OFF cultures, respectively. Each experiment was done in duplicate at least five times.

### **2.3.3. Calculation of the switch frequency.**

Lysogen strains were inoculated onto M9- glycerol-X-Gal plates supplemented with L-leucine or L-alanine or left unsupplemented. Colonies showing a uniform phenotype were resuspended in M9 salts. Appropriate dilutions were spread onto the same medium as the parent colony. After growth, the colonies were scored for a light blue or dark blue phenotype. The switch frequencies were calculated using the formula  $(M/N)/g$ , where M is the number of cells that underwent phase transition, N is the total number of cells evaluated, and g is the total number of generations, estimated to be 25, that gave rise to the colony.

### 2.3.4. DNA sequencing.

For sequencing of DNA regions adjacent to the *clp* operon, the genome walker kit from Clontech Laboratories was used. p31A DNA was digested by restriction endonucleases that generate blunt ends and ligated to the adaptors provided in the kit as specified by the manufacturer. PCR amplification using the adaptor primer and a *clp*-specific primer allowed sequencing of unknown DNA fragments adjacent to *clp* without previous cloning. Templates for DNA sequencing were prepared using a PE Applied Biosystem dye terminator cycle-sequencing kit. Products were analyzed on an ABI Prism 310 DNA sequencer. Oligonucleotides were from Eurogentec or MWG Biotech.

### 2.3.5. DNA hybridizations.

For chromosomal MC4100.6 DNA purification, a single blue or a single white colony was picked from M9-glycerol-X-Gal agar, resuspended in M9 salts, and used to inoculate three flasks containing the appropriate medium. Isoleucine (0.4 mM) and valine (0.6 mM) were added to the medium containing 5 mM leucine. Chromosomal DNA was isolated from overnight cultures using the DNeasy tissue kit (Qiagen). Aliquots of the cultures used for DNA purification were plated on the corresponding medium to calculate the percentage of ON cells. Digestions with restriction endonucleases MboI and DpnI were performed as specified by the manufacturer. DNA restriction fragments were separated by electrophoresis on 1.5% agarose in TBE buffer and transferred to a nylon membrane (Hybond N+; Amersham Biotech) in 20x SSC (0.3 M sodium citrate, 0.33 M NaCl [pH 7.0]) using a vacuum blotter (Appligene). Transfer was carried out at 4.5 kPa for 60 min. DNA fragments were cross-linked to the filter with UV light by using a Spectrolinker (Spectronics Corp.). The filter was probed with digoxigenin-labeled DNA (240 bp) generated by PCR using the PCR DIG probe synthesis kit (Roche) and primers RU (5'-CCTGTTTGATTTCGTGC-3') and RD (5'-CTGCAGCGAAGATTATC-3'). Hybridization was detected by chemiluminescence using CDP-Star (NEN) as a substrate for alkaline phosphatase. Quantification was performed by densitometry analysis using the Diversity DataBase software from Bio-Rad.

## 2.4. Results.

### 2.4.1. CS31A phase variation.

To analyze CS31A phase variation, we attempted to clone the *clp papI* homologue. By analogy to other fimbrial operons belonging to the P regulatory family, we supposed that the *papI* homologue would be present upstream or downstream next to the *clp* operon. However, nucleotide sequencing revealed that diverse insertion sequences and transposons flank the *clp* operon up to 7.8 kb upstream and 4.6 kb downstream. An open reading frame presenting 44% identity to the functional *clpB* gene is present 3 kb downstream of the *clp* operon but is isolated and also flanked by insertion sequences or unknown sequences (Fig. 1). Furthermore, our numerous efforts to clone the *papI* homologue from plasmid p31A were unsuccessful. PCR assays using *afaF*- or *papI*-derived primers failed to amplify a DNA fragment from p31A. A p31A DNA library was constructed and hybridized at high stringency with a 400-bp *afaF* probe (28). Hybridization was found only with a 65-bp sequence derived from an insertion sequence. No more hybridization was found after deletion of this sequence in the probe, even at low stringency. Transformation of p31A in MC4100.6 or MC4100.15 failed to restore phase variation. Either this gene indeed exists on p31A and we were not able to clone it, or CS31A phase variation is controlled by a PapI homologue encoded to a related chromosomally located operon. We therefore decided to analyze CS31A phase variation by using in trans AfaF, the PapI homologue belonging to the *afa-3* gene cluster. Afa-3 is a nonfimbrial adhesin (15) with a structural organization more closely related to CS31A than to P-fimbriae. AfaF was chosen because the ClpB and AfaA regulators (PapB homologues) have 60.6% amino acid sequence identity (28). Furthermore, we have shown previously that plasmid ptrf1, harboring *afaF* under the control of the *trc* promoter, promotes phase variation when introduced into *E. coli* strains harboring *clp-lacZYA* transcriptional fusions (28). To study transcriptional *clp* regulation, we used different strains that harbor a single chromosomal *clp-lacZYA* transcriptional fusion, with (6 lysogens) or without (15 lysogens) an intact *clpB* gene (Fig. 1). The fusions were created either in MC4100 *E. coli* or in DL844 *E. coli* to provide Lrp<sup>+</sup> or Lrp<sup>-</sup> backgrounds, respectively. As already demonstrated, uniform blue colonies arose by plating 6 or 15 lysogens on M9-glycerol plates containing X-Gal in the absence of AfaF (28). Table

1 shows that ClpB and Lrp regulated the *clp* basal transcription even in the absence of the phase variation control (i.e., in the absence of AfaF): comparison of DL844.6 (493 MU) with MC4100.6 (112 Miller units [MU]) showed that Lrp played a repressive role. Similarly, comparison of MC4100.15 (775 MU) with MC4100.6 (112 MU) showed that ClpB also played a repressive role, which was previously demonstrated in MC4100.15 complemented in trans by pCLB99, a multicopy plasmid expressing *clpB* under the control of the *trc* promoter (28). It is not clear why the transcription was not totally derepressed in the DL844.15/1 strain, which lacks Lrp and ClpB (see Discussion). After the plasmid encoding AfaF was introduced into the strains, phase variation occurred only in the Lrp+ backgrounds, with emergence of a majority of white colonies among the blue ones, indicating a global repressive effect. Measurements of the  $\beta$ -galactosidase activity of Lac+ (phase-ON) and Lac- (phase-OFF) colonies are reported in Table 1. Transcription was highly repressed in phase-OFF cells (18 and 38 MU in ClpB+ and ClpB- strains, respectively). When AfaF was overexpressed due to the addition of 1 mM IPTG to the growth medium, the colonies presented a uniform Lac- phenotype on M9-glycerol-X-Gal agar plates, indicating that transcription of *clp-lacZ* was completely inactive (data not shown). Without Lrp, transcription was locked in the ON phase [DL844.6(ptrf1), 338 MU]. Thus, Lrp was required for repression of the promoter and emergence of phase-OFF cells. However, when we took into account the fraction of phase ON cells in the MC4100.6(ptrf1) colonies, it appeared that the transcription level of phase-ON cells was higher than in the absence of AfaF (87 MU for 21% of phase ON-cells versus 112 MU for 100% of phase-ON cells). Since AfaF had no regulatory effect in an Lrp- background [Table 1, DL844.15/1 versus DL844.15/1(ptrf1)], our data suggest that AfaF modulated the regulatory activity of Lrp by increasing its repressive effect in a large fraction of cells (phase OFF) and by conferring to it an activating activity in the remaining fraction (phase ON). In contrast, ClpB was not required for the phase variation to occur. The ClpB-dependent repression was still effective in phase-ON cells [compare MC4100.6(ptrf1) to MC4100.15(ptrf1)]. However, results obtained with MC4100.15(ptrf1) were difficult to analyze: while Lac- colonies were really white, Lac+ colonies presented all the gradations of blue, leading to a fraction of phase-ON cells in a Lac+ colony that varied greatly from one experiment to another [which was not the case for MC4100.6(ptrf1)], ranging from 6 to 78%. Such a variability has already been observed in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium populations expressing Pef fimbriae (32), but it remains unexplained.

### 2.4.2. Influence of leucine and alanine on *clp* expression.

Because CS31A is one of the only two known P-related fimbriae sensitive to leucine and alanine, we analyzed in further detail the effect of these amino acids on *clp* transcription. Alanine abolished *clp* transcription, locking cells in phase OFF (Table 1). In contrast, leucine did not dramatically alter the switch frequency of phase variation. We measured the  $\beta$ -galactosidase activity in different strain backgrounds starting either from a Lac<sup>+</sup> or from a Lac<sup>-</sup> colony grown on M9-glycerol-X-Gal with L-alanine or L-leucine (Table 1). Alanine and, to a lesser extent, leucine dramatically decreased *clp* transcription in MC4100.6 and MC4100.15 strains in the presence and absence of AfaF. Repression was also observed in the Lrp- ClpB<sup>+</sup> (DL844.6) backgrounds with and without AfaF. However, in the simultaneous absence of ClpB and Lrp [DL844.15(ptrf1) and DL844.15], neither leucine nor alanine repressed *clp* transcription.

### 2.4.3. DNA methylation pattern analysis.

In the absence of AfaF (i.e., in the absence of phase variation), the GATCdist site was methylated and the GATCprox site was protected from methylation in about 50% of the DNA molecules whereas both GATCdist and GATCprox sites were methylated in the remaining 50% of DNA molecules. This methylation pattern was similar in ClpB<sup>+</sup> and ClpB<sup>-</sup> strains. In an Lrp<sup>-</sup> background, both GATC sites were methylated in 100% of the molecules (28). By analogy to *pap*, it was concluded that Lrp was bound to the GATCprox site in 50% of the molecules and that the affinity of Lrp for GATCprox is stronger than for GATCdist. To determine whether AfaF, leucine, or alanine modifies the methylation pattern, we performed Southern analyses on MC4100.6 and MC41006(ptrf1) DNA. Single colonies cultured on M9-glycerol-X-Gal were used to inoculate M9-glycerol supplemented with the amino acids or left unsupplemented. For MC41006(ptrf1), inoculation was done with either a Lac<sup>+</sup> or a Lac<sup>-</sup> colony. The corresponding percentage of phase-ON cells was calculated. MC4100.6 cells presented a uniform phenotype; therefore, a single colony was picked at random. DNA was digested with DpnI, which cuts only methylated GATC sites, or MboI, which cuts only nonmethylated GATC sites, and hybridized with a digoxigenin

DNA probe that encompasses the two GATC sites (Fig. 2). The results obtained (Fig. 2) are schematically represented in Table 2.

In the absence of AfaF and the presence of alanine, fewer than 40% of the DNA molecules presented methylation protection of GATCprox (Fig. 2; Table 2), suggesting that alanine slightly lowered the affinity of Lrp for its target GATCprox site. Leucine altered the methylation pattern in the same way, but its effect was more drastic since only 25% of the DNA molecules were protected from methylation on GATCprox.

In the presence of AfaF, the DNA molecules from a Lac<sup>-</sup> colony cultured in M9-glycerol-X-Gal showed methylated GATCdist sites whereas GATCprox sites were protected from methylation. Since 94% of the colonies presented a Lac<sup>-</sup> phenotype, we can assume that this methylation pattern is characteristic of phase-OFF cells and that the method was not sensitive enough to detect molecules corresponding to fewer than 6% of the cells. DNA molecules from a Lac<sup>+</sup> colony presented two methylation patterns: 62% of the molecules showed the methylation pattern characteristic of phase-OFF cells, and 37% of the molecules showed the opposite pattern, with GATCdist protected from methylation and with methylated GATCprox sites. These patterns correlated well with the 56% Lac<sup>-</sup> colonies and 44% Lac<sup>+</sup> colonies observed in the culture. Thus, we can assume that the characteristic pattern of phase-ON cells is GATCdist protected from methylation and GATCprox methylated. Comparison of the methylation patterns of the AfaF<sup>-</sup> and AfaF<sup>+</sup> cells grown in M9-glycerol suggests that AfaF increased the affinity of Lrp for GATCprox, producing highly repressed phase-OFF cells, and that in a small proportion of cells, AfaF allowed Lrp binding to GATCdist, producing activated phase-ON cells. Together with measurement of  $\beta$ -galactosidase activities, our results indicate that maximal repression requires Lrp binding to GATCprox and maximal activation Lrp binding to GATCdist. When alanine was added to the growth medium, 100% of the colonies appeared Lac<sup>-</sup>. This phenotype correlated well with 95% of the DNA molecules presenting the methylation pattern characteristic of phase-OFF cells and 5% being fully methylated. Leucine had a less drastic effect on *clp* transcription since phase variation still occurred. The Lac<sup>-</sup> colony presented the same methylation patterns as the colonies cultured in alanine and was composed of 95% of Lac<sup>-</sup> cells. The Lac<sup>+</sup> colony presented 12% Lac<sup>+</sup> cells, and 13% of the DNA molecules showed the methylation pattern characteristic of phase-ON cells in

addition to the two methylation patterns observed in the Lac- colony. Comparison of the methylation patterns with and without the amino acids shows that leucine decreased and alanine prevented the AfaF-dependent methylation protection of GATCdist. In consequence, alanine prevented the emergence of phase-ON cells. Furthermore, alanine increased the methylation protection of GATCprox since 95% of the DNA molecules from AfaF+ cells presented GATCprox protected from methylation in the presence of alanine instead of 62% in its absence.

## 2.5. Discussion.

CS31A, encoded by the *clp* operon, belongs to the P-regulatory family of fimbriae. Its expression is subject to a tight control at the transcriptional level, mediated by the global regulator Lrp, as well as by two specific regulators, ClpB and a PapI homologue, and is dramatically repressed by L-leucine and L-alanine. Leucine bound to Lrp modulates the expression of a number of operons by altering the affinity of Lrp for its target sites. In some cases, alanine plays the same role as leucine. The mode of action of leucine on operons subjected to phase variation control, involving an Lrp binding protein of the PapI family, has not been investigated until now. The intensively studied *pap* operon is insensitive to leucine, and CS31A and F165<sub>1</sub> are the only two fimbriae of the P-regulatory family known to be responsive to leucine and alanine. In this study, we investigated the molecular mechanisms of the phase variation control and the influence of leucine and alanine on *clp* expression by analyzing their effects (i) on the *clp* promoter, which is repressed by Lrp and ClpB independently of phase variation, and (ii) on phase variation, which is mediated by Lrp and the PapI homologue AfaF.

AfaF was used in this study because our numerous efforts to clone the homologous PapI homologue from the p31A virulence plasmid were unsuccessful. These results suggest that p31A does not harbor a *clp* specific homologue to *papI*. The phase variation control observed in wild-type strains could result from a cross talk between *clp* and a chromosomal *pap*-related operon. Recently it has been shown that the reference strain 31A encodes P fimbriae (1). Whether PapI encoded by this *pap* operon indeed cross-regulates *clp* transcription has not yet been investigated. Functional complementation with heterologous

PapI homologues has already been demonstrated: PefI expressed from a multicopy plasmid activates *papBA* transcription in *E. coli* whereas it represses *pef* transcription in *S. enterica* serovar Typhimurium (32), and PapI, which is a positive regulator of *pap* transcription, represses K88 production, as does the homologous FaeA regulator (22). SfaC and DaaF, controlling the production of S and F1845 fimbriae, respectively, are also functional PapI homologues (38). Therefore, it was rational to assume that AfaF would regulate *clp* expression in the same manner as would the homologous Clp regulator.

A regulatory model for *clp* expression may be proposed (Fig. 3). We have shown previously that both GATC sites are methylated in the absence of Lrp and that methylation protection of these sites requires Lrp but does not require ClpB (28). By analogy to Pap, we postulate that Lrp protects the GATC sites from methylation and cannot bind methylated GATC sites. Lrp presents a lower affinity for GATCdist than for GATCprox. The *clp* basal transcription level is low due to the repression exerted by ClpB and Lrp, which is bound to GATCprox (Fig. 3A). Leucine and alanine decrease the affinity of Lrp for GATCprox and repress *clp* basal transcription by a noncharacterized Lrp-independent mechanism (Fig. 3B). AfaF, the PapI homologue, is required for Lrp to bind GATCdist and increases the affinity of Lrp for GATCprox, so that phase variation can occur. The methylation pattern characteristic of phase-ON cells is GATCdist protected from methylation and GATCprox methylated (Fig. 3C), whereas the methylation pattern characteristic of phase-OFF cells is the opposite (GATCdist methylated and GATCprox protected) (Fig. 3D). Leucine lowers and alanine prevents Lrp binding to GATCdist. Leucine and alanine thus appear as antagonists of AfaF for Lrp binding to GATCdist. By contrast, alanine acts in conjunction with AfaF to increase Lrp binding to GATCprox, so that cells are locked in a highly repressed OFF phase independently of ClpB. Whether maximal repression by alanine also involves the Lrp-independent mechanism cannot be determined (Fig. 3E).

According to this model, a high level of transcription should be expected in the simultaneous absence of Lrp, ClpB, and AfaF (DL844.15/1), but this was not the case (276 MU). It has been shown that *pap* transcription is highly repressed by H-NS in the absence of Lrp (39). We could hypothesize that *clp* transcription is moderately repressed by H-NS or another unidentified regulatory protein in the absence of Lrp and ClpB. This repression



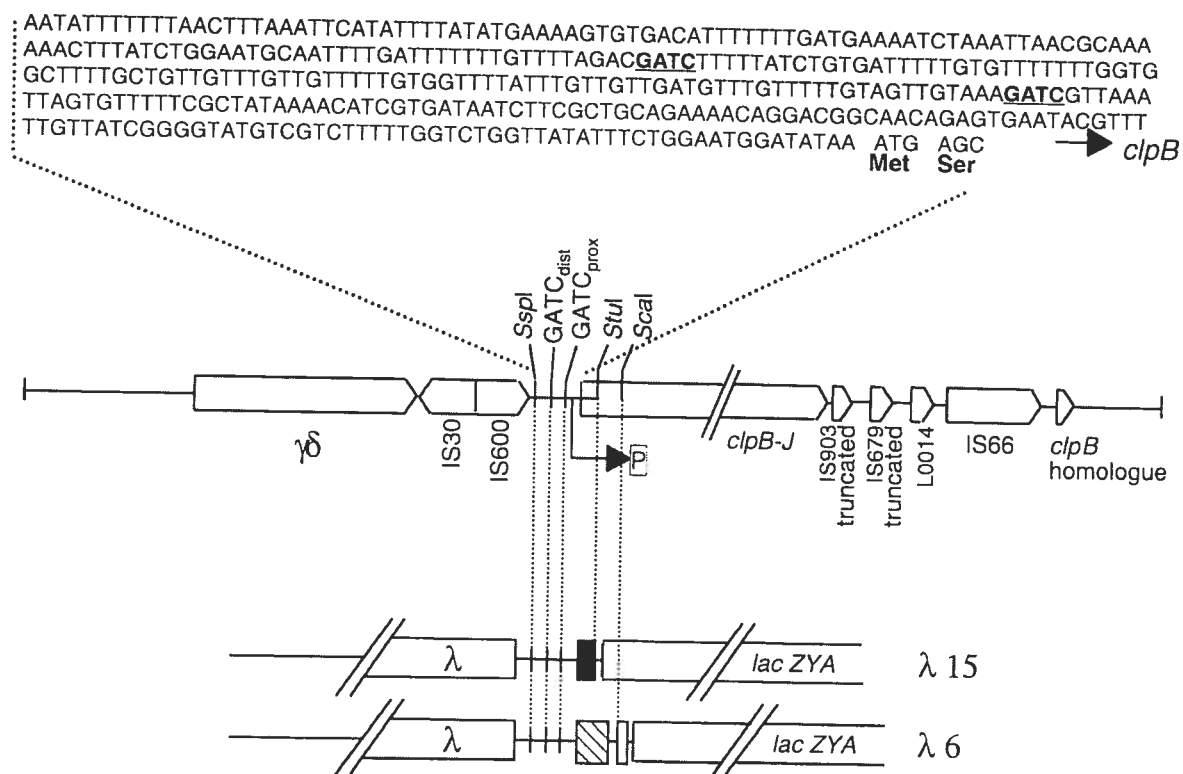
could be alleviated by Lrp or ClpB individually but amplified by the simultaneous action of Lrp and ClpB.

Without AfaF, about 50% of the DNA molecules were methylated on both GATC sites whereas in the other 50%, GATCprox was protected from methylation. Thus, under these conditions all GATCdist sites were methylated. A hypothesis to explain this result is that Lrp by itself has no affinity for GATCdist and that Dam and Lrp bind equally to GATCprox, so that at each replication cycle, Lrp binds to half of the GATCprox sites. This pattern was not observed in the presence of AfaF. AfaF by itself had no direct effect on *clp* transcription. Rather, it modified the affinity of Lrp for the GATC sites. In phase-OFF cells, AfaF increased Lrp binding to GATCprox, so that this site was protected from methylation in 100% of the DNA molecules, leading to a highly repressed state. In phase-ON cells, AfaF allows Lrp binding to GATCdist. Thus, Lrp plays dual roles as both an AfaF-dependent activator (when bound to GATCdist) and a repressor (when bound to GATCprox) of *clp* transcription, similar to its role with the *pap* operon (39). GATCdist and GATCprox could be considered activator and repressor sites, respectively. However, *pap* expression is totally abrogated in the absence of PapI (41) whereas *clp* transcription is active in the absence of AfaF. High levels of PapI increase *pap* transcription (34, 39), whereas high levels of AfaF abrogate *clp* expression. Similarly, transcription of *pef* (Pef pili in *S. enterica* serovar Typhimurium) is repressed by PefI, the PapI/AfaF counterpart (32). To explain these differences, Hernday et al. (21) suggested that the binding of Lrp to *pef* sites around GATCdist would occur with the highest affinity, with PefI facilitating the transition to the OFF state by movement of Lrp to sites around GATCprox. Clearly, this is not the case for *clp*, as demonstrated by our results. The differences between *clp* and *pap* expression could, instead, be due to different Lrp-binding sites, to divergent nucleotide sequences surrounding the GATC sites, and to the different action of the other regulatory proteins on the promoter region. Indeed, ClpB is a repressor of *clp* expression whereas PapB at physiological levels has no direct influence on the *papBA* promoter. Transcription of *pap* but not of *clp* requires Lrp binding to GATCdist (6, 39) and is highly repressed by H-NS in the absence of Lrp (39). In contrast, the *clp* promoter is moderately active in the absence of Lrp, ClpB, and AfaF, suggesting that H-NS or another unidentified regulatory protein acts as a repressor of *clp* expression less efficiently than does Lrp or ClpB.

Among fimbriae belonging to the P-regulatory family, only CS31A and F165<sub>1</sub> respond to leucine and alanine levels (10, 19, 28). The synthesis of K99 and type 1 fimbriae is also sensitive to leucine and alanine (11, 14). However, expression of these fimbriae is controlled by a mechanism involving Lrp but is distinct from that of members of the P-regulatory family, and the mode of action of leucine and alanine is not well understood. Two mechanisms by which leucine and alanine repress *clp* transcription were evidenced in this study. First, alanine and leucine repressed the basal transcription about twofold in the absence of Lrp, and this repression required ClpB (Table 1). Second, alanine and leucine altered the methylation patterns in the presence of Lrp, suggesting that they modified the affinity of Lrp for its target sites: in the absence of AfaF, alanine and leucine increased methylation of GATCprox (Table 2). This leads to an increase in the amount of fully methylated DNA. However, fully methylated DNA is probably not associated with the repression of *clp* expression, since *clp* transcription is active in an Lrp-negative background (Table 1). This indicates that the twofold repression observed in the absence of AfaF is due mainly to the Lrp-independent mechanism. In the presence of AfaF, alanine prevented and leucine decreased the AfaF-dependent methylation protection of GATCdist, acting as antagonists of AfaF. In addition, alanine acted in conjunction with AfaF to increase methylation protection of GATCprox. These results suggest that alanine and leucine decreased Lrp binding to the site with the lowest affinity (GATCdist) and increased or had no effect, respectively, on Lrp binding to the site with the highest affinity (GATCprox).

It has been shown that leucine antagonizes the activating action of Lrp on *ilvIH* and *gluBDF* promoters and its repressive effect on the *lysU* promoter by reducing the affinity of Lrp for its binding sites (13, 25, 37). Zhi *et al.* (43) have identified Lrp-binding sites in the *dadAX* promoter region. Lrp sites that overlap the *dad* promoters are involved in repression, whereas sites upstream of the promoters are required for activation. Leucine and alanine, which activate *dad* expression, decrease the affinity of Lrp to repressor sites while having little or no effect on the binding of Lrp to activator sites. The inverse situation is found in *clp* expression: leucine or alanine, which repress *clp* expression, increase the methylation protection of the repressor site (GATCprox) and dramatically reduce the methylation protection of the activator site (GATCdist). Since methylation protection is very probably due to Lrp binding, in both cases leucine or alanine decreases the binding of Lrp to low-affinity sites. However, in the case of *clp*, an extra protein (AfaF) is required to increase the

affinity of Lrp for the repressor site, and leucine and alanine appear as agonists of AfaF. Direct interaction between leucine and Lrp has been demonstrated (27), and Lrp mutations which cause Lrp to be insensitive to leucine have been identified (35). It has been shown that Lrp self-associates in vitro to form a hexadecamer and an octamer and that leucine induces the dissociation of the Lrp hexadecamer to an octamer (8). The authors proposed a model for operons for which the effects of Lrp are potentiated by leucine: the Lrp octamer would bind with moderate affinity, and leucine would potentiate the effect of Lrp by increasing the amounts of leucine-bound octamers. However, the Lrp-mediated regulation of *clp* expression is even more complex, since Lrp binding requires an extra protein such as AfaF.



**Fig. 1 :** The *clp* regulatory region, sequences surrounding the *clp* operon, and operon fusion constructs.

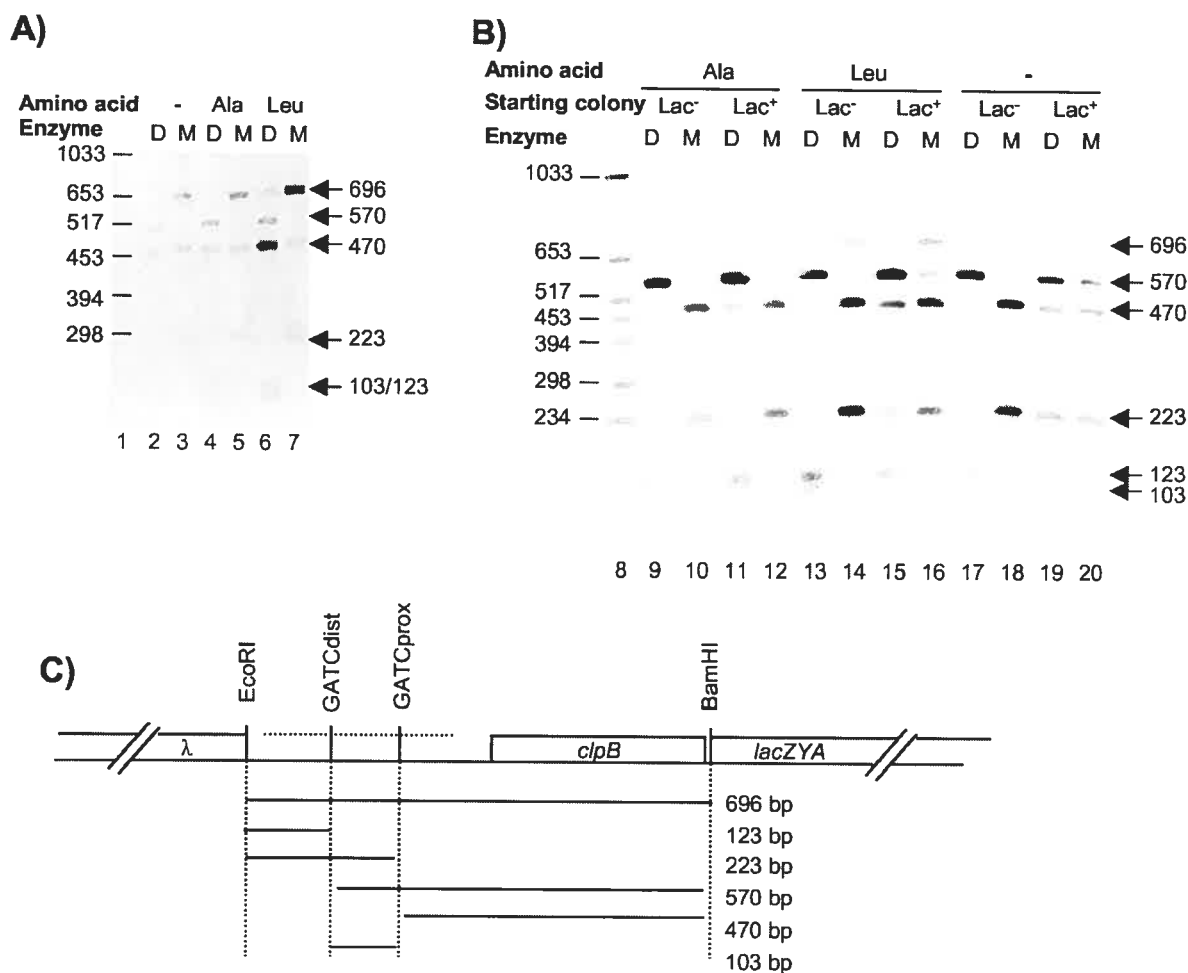
The nucleotide sequence of the *clp* regulatory region is shown at the top, with the GATC sites in bold. The GenBank accession number for this sequence is L48184. The organization of DNA surrounding the *clp* operon is shown below the regulatory region. Boxes with arrowheads indicate the positions of sequences with high homologies to sequences present in data banks as found using the BLASTn program (National Center for Biotechnology Information). The operon fusion constructs are shown in expanded scale at the bottom. The *clpB* gene is truncated in 15 (black box) and is entire in 6 (hatched box). P indicates the putative *clp* promoter.

Strain	Genotype	Growth Medium <sup>a</sup>	Starting colony	Switch frequency		b-galactosidase activity (MU) <sup>c</sup>	% phase-ON cells
				ON to OFF	OFF to ON		
MC4100.λ6	<i>clpB</i> <sup>+</sup> <i>lrp</i> <sup>+</sup> <i>afaF</i> <sup>-</sup>	M9	U <sup>b</sup>			112 ± 9	
		M9-alanine	U			36 ± 3	
		M9-leucine	U			53 ± 7	
MC4100.λ6 (ptrf1)	<i>clpB</i> <sup>+</sup> <i>lrp</i> <sup>+</sup> <i>afaF</i> <sup>+</sup>	M9	Phase-ON	3.16 x 10 <sup>-2</sup>		87 ± 21	21.1
			Phase-OFF		1.47 x 10 <sup>-3</sup>	18 ± 5	3.68
		M9-alanine	U			10 ± 3	
		M9-leucine	Phase-ON	3.24 x 10 <sup>-2</sup>		47 ± 22	19.12
			Phase-OFF		1.81 x 10 <sup>-3</sup>	8 ± 3	4.53
DL844.λ6	<i>clpB</i> <sup>+</sup> <i>lrp</i> <sup>-</sup> <i>afaF</i> <sup>-</sup>	M9	U			493 ± 59	
		M9-alanine	U			197 ± 39	
		M9-leucine	U			250 ± 3	
DL884.λ6 (ptrf1)	<i>clpB</i> <sup>+</sup> <i>lrp</i> <sup>-</sup> <i>afaF</i> <sup>+</sup>	M9	U			338 ± 57	
		M9-alanine	U			163 ± 33	
		M9-leucine	U			200 ± 66	
MC4100.λ15	<i>clpB</i> <sup>-</sup> <i>lrp</i> <sup>+</sup> <i>afaF</i> <sup>-</sup>	M9	U			775 ± 60	
		M9-alanine	U			170 ± 20	
		M9-leucine	U			238 ± 71	
MC4100.λ15 (ptrf1)	<i>clpB</i> <sup>-</sup> <i>lrp</i> <sup>+</sup> <i>afaF</i> <sup>+</sup>	M9	Phase-ON	2.37 x 10 <sup>-2</sup>		336 ± 144	40.35
			Phase-OFF		1.15 x 10 <sup>-3</sup>	38 ± 11	2.96
		M9-alanine	U			11 ± 4	
		M9-leucine	Phase-ON	2.64 x 10 <sup>-2</sup>		152 ± 30	33.6
			Phase-OFF		1.16 x 10 <sup>-3</sup>	31 ± 4	2.91
DL844.λ15 /1	<i>clpB</i> <sup>-</sup> <i>lrp</i> <sup>-</sup> <i>afaF</i> <sup>-</sup>	M9	U			276 ± 36	
		M9-alanine	U			202 ± 28	
		M9-leucine	U			295 ± 47	
DL844.λ15 /1 (ptrf1)	<i>clpB</i> <sup>-</sup> <i>lrp</i> <sup>-</sup> <i>afaF</i> <sup>+</sup>	M9	U			278 ± 81	
		M9-alanine	U			221 ± 44	
		M9-leucine	U			290 ± 26	

**Table 1** : Transcription levels of *clp-lacZYA* in different media and different genetic backgrounds.

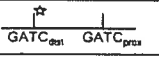

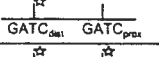
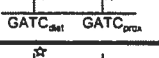
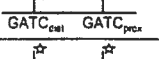
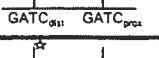
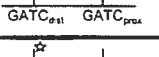
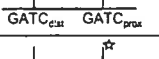
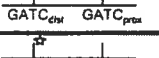
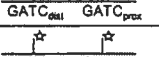
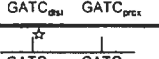
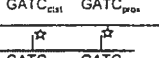
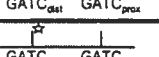
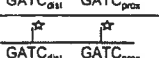
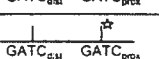
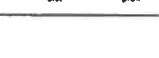
<sup>a</sup> Glycerol is the carbon source. Media containing leucine are supplemented with isoleucine (0.4 mM) and valine (0.6 mM). <sup>b</sup> U, uniform phenotype of the colonies.

<sup>c</sup> Results are the mean ± standard deviations of at least five independent experiments made in duplicate.

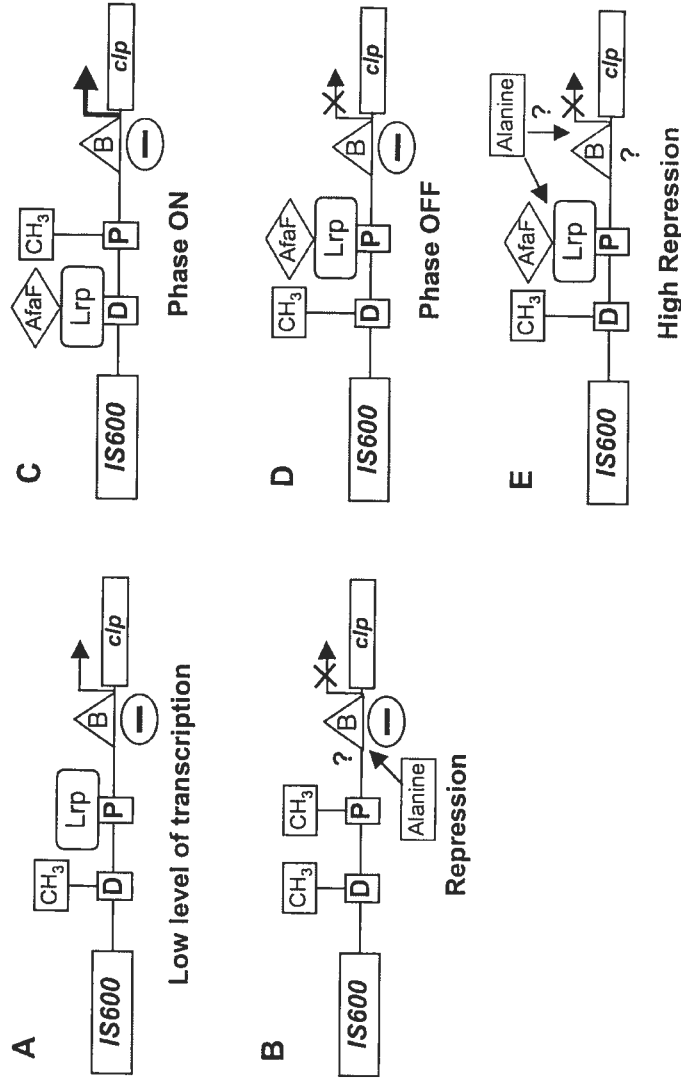


**Fig. 2 :** Analysis of the in vivo GATC methylation states of the *clp* regulatory region.

A Southern blot of chromosomal DNA obtained from MC4100.6 (A) and MC4100.6(*ptrf1*) (B) grown in M9-glycerol (lanes 2, 3, and 17 to 20), in M9-glycerol plus alanine (lanes 4, 5, and 13 to 16), or in M9-glycerol plus leucine, isoleucine, valine (lanes 6, 7, and 9 to 12) is shown. For MC4100.6, a colony grown on M9-glycerol was chosen at random among uniform colonies as the starting material. For MC4100.6(*ptrf1*), a Lac<sup>+</sup> and a Lac<sup>-</sup> colony were used as the starting material. The DNA was digested with *Bam*HI plus *Eco*RI and either *Dpn*I (D) or *Mbo*I (M). DNA hybridization was carried out with the digoxigenin-labeled probe indicated in panel C by a horizontal dotted line. The digoxigenin-labeled DNA molecular weight marker VI (Roche) was loaded in lanes 1 and 8. Its fragment sizes are indicated on the left. Size of DNA fragments that hybridized with the probe are shown on the right. (C) Schematic representation of DNA fragments that may hybridize with the probe.

Starting colony and growth medium <sup>a</sup>	Methylation pattern <sup>b</sup>	% of DNA molecules	% of Lac <sup>+</sup> cells	% of Lac <sup>-</sup> cells
AfaF <sup>-</sup> , M9		48.5	NA <sup>c</sup>	NA
		51.5		
AfaF <sup>-</sup> , M9-alanine		36.5	NA	NA
		63.5		
AfaF <sup>-</sup> , M9-leucine		24.5	NA	NA
		75.5		
AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>-</sup> , M9		100	6	94
AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup> , M9		62	44	56
		37		
AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>-</sup> or AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup> M9-alanine		95		100
		5		
		89		
AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>-</sup> , M9-leucine		11		
		65		
AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup> , M9-glycerol leucine		21	12	88
		13		

**Table 2 :** Methylation patterns of the *clp* regulatory region



**Fig. 3 :** Model for control of *clp* expression by Lrp, AfaF, ClpB, and alanine.

D and P in open squares represent GATCdist and GATCprox sites, respectively. B in a triangle represents ClpB. The minus sign in an oval indicates a repressive effect on *clp* basal transcription. (A) Low level of basal transcription in the absence of AfaF and alanine; GATCdist is methylated, whereas Lrp is bound to GATCprox; ClpB is bound near to the promoter region. (B) Alanine represses the basal transcription independently of Lrp by an unknown mechanism and decreases Lrp binding to GATCprox. (C and D) AfaF bound to Lrp allows Lrp binding to GATCdist in phase-ON cells (C) and increases Lrp binding to GATCprox in phase-OFF cells (D). (E) Alanine prevents the Lrp-AfaF complex from binding to GATCdist and increases its binding to GATCprox, locking cells in the OFF phase.



## 2.6. References.

1. **Bertin, Y., J. Girardeau, A. Darfeuille-Michaud, and C. Martin.** 2000. Epidemiological study of *pap* genes among diarrheagenic or septicemic *Escherichia coli* strains producing CS31A and F17 adhesins and characterization of Pap<sub>31A</sub> fimbriae. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:1502-9.
2. **Blyn, L. B., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1990. Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential *dam* methylation states. *EMBO Journal* **9**:4045-4054.
3. **Blyn, L. B., B. A. Braaten, C. A. White-Ziegler, D. H. Rolfson, and D. A. Low.** 1989. Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional regulation. *EMBO Journal* **8**:613-20.
4. **Braaten, B. A., L. B. Blyn, B. S. Skinner, and D. A. Low.** 1991. Evidence for a methylation-blocking factor (*mbf*) locus involved in *pap* pilus expression and phase variation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **173**:1789-1800.
5. **Braaten, B. A., X. Nou, L. S. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1994. Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**:577-588.
6. **Braaten, B. A., J. V. Platko, M. W. van der Woude, B. H. Simons, F. K. de Graaf, J. M. Calvo, and D. A. Low.** 1992. Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the *pap* and *fan* pili operons in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**:4250-4.
7. **Calvo, J., and R. G. Matthews.** 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* **58**:466-90.
8. **Chen, S., M. H. Rosner, and J. M. Calvo.** 2001. Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (LRP) from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **312**:625-635.
9. **Contrepois, M., H. C. Dubourguier, A. L. Parodi, J. P. Girardeau, and J. Ollier.** 1986. Septicemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. *Veterinary Microbiology* **12**:109-118.

10. **Daigle, F., C. Forget, C. Martin, M. Drolet, M. C. Tessier, H. Dezfoulian, and J. Harel.** 2000. Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Research in Microbiology* **151**:1-12.
11. **De Graaf, F. K., P. Klaasen, and J. E. van Hees.** 1980. Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. *Infection and Immunity* **30**:125-128.
12. **Di Martino, P., Y. Bertin, J. Girardeau, V. Livrelli, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud.** 1995. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and Immunity* **63**:4336-44.
13. **Ernsting, B. R., J. W. Denninger, R. M. Blumenthal, and R. G. Matthews.** 1993. Regulation of the *glbBDF* operon of *Escherichia coli*: How is a leuxine-incensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? *Journal of Bacteriology* **175**:7160-7169.
14. **Gally, D. L., J. A. Bogan, B. I. Eisenstein, and I. C. Blomfield.** 1993. Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *Journal of Bacteriology* **175**:6186-6193.
15. **Garcia, M. I., P. Gounon, P. Courcoux, A. Labigne, and C. Le Bouguénec.** 1996. The afimbrial adhesive sheath encoded by the *afa-3* gene cluster of pathogenic *Escherichia coli* is composed of two adhesins. *Molecular Microbiology* **19**:683-693.
16. **Girardeau, J., M. Der Vartanian, J. Ollier, and M. Contrepois.** 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity* **56**:2180-8.
17. **Göransson, M., K. Forsman, P. Nilsson, and B. E. Uhlin.** 1989. Upstream activating sequences that are shared by two divergently transcribed operons mediate cAMP-CRP regulation of pilus-adhesin in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **3**:1557-1565.
18. **Harel, J., F. Daigle, C. Forget, M. C. Tessier, C. Crost, and C. Martin.** 2000. Phase variation of F165(1) (Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicaemia in animals. *Canadian Journal of Microbiology* **46**:1101-1107.

19. **Harvill, E. T., and J. F. Miller.** 2000. Manipulating the host to study bacterial virulence. *Current Opinion in Microbiology* **3**:93-96.
20. **Henderson, I. R., P. Owen, and J. P. Nataro.** 1999. Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation (MicroReview). *Molecular Microbiology* **33**:919-932.
21. **Herdnay, A., M. Krabbe, B. Braaten, and D. Low.** 2002. Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**:16470-16476.
22. **Huisman, T. T., D. Bakker, P. Klaasen, and F. K. de Graaf.** 1994. Leucine-responsive regulatory protein, IS1 insertions, and the negative regulator FaeA control the expression of the *fae* (K88) operon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **11**:525-36.
23. **Jallat, C., A. Darfeuille-Michaud, J. Girardeau, C. Rich, and B. Joly.** 1994. Self-transmissible R plasmids encoding CS31A among human *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal stools. *Infection and Immunity* **62**:2865-73.
24. **Kaltenbach, L. S., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1995. Specific binding of PapI to Lrp-pap DNA complexes. *Journal of Bacteriology* **177**:6449-6455.
25. **Lin, R., B. Ernsting, I. N. Hirshfield, R. G. Matthews, F. C. Neidhart, C. R.L., and E. B. Newman.** 1992. The *lrp* gene product regulates expression of *lysU* in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **174**:2779-84.
26. **Low, D. A., B. Braaten, and M. Van Der Woude.** 1996. Fimbriae., p. 146-157. In I. J. L. Curtiss III R., Lin E. C. C., Low K. B., Magasanik B., Reznikoff W. S., Riley M., Schaechter M., Umbrager H. E. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*., 2nd ed, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington DC.
27. **Marasco, R., M. Varcamonti, F. La Cara, M. Ricca, M. De Felice, and M. Sacco.** 1994. *In vivo* footprinting analysis of Lrp binding to *ilvIH* promoter region of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **176**:5197-5201.
28. **Martin, C.** 1996. The *clp* (CS31A) operon is negatively controlled by Lrp, ClpB, and L-alanine at the transcriptional level. *Molecular Microbiology* **21**:281-92.
29. **Martin, C., C. Boeuf, and F. Bousquet.** 1991. *Escherichia coli* CS31A fimbriae: molecular cloning, expression and homology with the K88 determinant. *Microbial Pathogenesis* **10**:429-42.

30. **Miller, J. F.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press,, Cold Spring Harbor, N.Y.
31. **Newman, E. B., and R. Lin.** 1995. Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. Annual Review of Microbiology **49**:747-75.
32. **Nicholson, B., and D. Low.** 2000. DNA methylation-dependant regulation of Pef expression in *Salmonella typhimurium*. Molecular Microbiology **35**:728-742.
33. **Nou, X., B. Braaten, L. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1995. Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. EMBO journal **14**:5785-97.
34. **Nou, X., B. Skinner, B. Braaten, L. Blyn, D. Hirsch, and D. Low.** 1993. Regulation of pyelonephritis-associated pili phase-variation in *Escherichia coli*: binding of the PapI and the Lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation. Molecular Microbiology **7**:545-53.
35. **Platko, J. V., and J. M. Calvo.** 1993. Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. Journal of Bacteriology **175**:1110-7.
36. **Powell, B., M. P. Rivas, D. L. Court, Y. Nakamura, and J. Turnbough.** 1994. Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. Nucleic Acids Research **22**:5765-5766.
37. **Ricca, E., D. A. Aker, and J. Calvo.** 1989. A protein that binds to the regulatory region of the *Escherichia coli* *ilvIH* operon. Journal of Bacteriology **171**:1658-1664.
38. **van der Woude, M., and D. Low.** 1994. Leucine-reponsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology **11**:605-618.
39. **van der Woude, M. W., L. S. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1995. Leucine-responsive regulatory protein plays dual roles as both an activator and a repressor of the *Escherichia coli* *pap* fimbrial operon. Molecular Microbiology **17**:303-312.
40. **Weyand, N. J., and D. A. Low.** 2000. Regulation of Pap phase variation. Journal of Biological Chemistry **275**:3192-3200.
41. **White-Ziegler, C. A., M. L. Angus Hill, B. A. Braaten, M. W. van der Woude, and D. A. Low.** 1998. Thermoregulation of *Escherichia coli* *pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. Molecular Microbiology **28**:1121-37.

42. **Xia, Y., K. Forsman, J. Jass, and B. E. Uhlin.** 1998. Oligomeric interaction of the PapB transcriptional regulator with the upstream activating region of pili adhesin gene promoters in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **30**:513-23.
43. **Zhi, J., E. Mathew, and M. Freundlich.** 1999. Lrp binds to two regions in the *dadAX* promoter region of *Escherichia coli* to repress and activate transcription directly. *Molecular Microbiology* **32**:29-40.

### **Implication de l'auteur dans cet article.**

En tant que premier auteur de cet article, j'ai réalisé la mise au point de la technique de retard sur gel pour les six sondes ADN. La totalité des expériences de retard sur gel sur les trois sondes  $F_{\text{dist-prox}}$ ,  $F_{\text{prox}}$  et  $F_{\text{dist}}$ , en présence ou absence de L-alanine ou de L-leucine ou de D-alanine ont été effectuées par le premier auteur, ainsi que les tests en présence de D-alanine avec les trois sondes ADN  $C_{\text{dist-prox}}$ ,  $C_{\text{prox}}$  et  $C_{\text{dist}}$ . La production, la purification et la quantification de la protéine 6Hist-Lrp ont été faites par le premier auteur. L'étude de la méthylation des sites GATC de la région promotrice de l'opéron *foo* a aussi été réalisée par le premier auteur. Le premier auteur a aussi analysé la totalité des résultats et rédigé l'intégralité de cet article.

### 3. ARTICLE III: INFLUENCE OF L-ALANINE AND L-LEUCINE ON METHYLATION OF GATC SITES AND LRP BINDING TO REGULATORY REGIONS OF THE *FOO* AND *CLP* OPERONS.

Running title: Alanine and leucine effect by Lrp on phase variation.

C. Crost (1,2), A. Caille (2), C. Martin (2) J. Harel(1)

Keywords: phase variation, Lrp, GATC methylation, adhesin.

(1) GREMIP, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, CANADA

(2) INRA, Clermont-Ferrand, France

#### 3.1. Abstract.

F165<sub>I</sub> and CS31A synthesized by septicemic *E. coli* strains belong to the Pap-regulatory family of adhesive factors, which are under the methylation-dependent transcriptional regulation. In contrast to the *pap* operon, the *foo* (encoding F165<sub>I</sub>) and the *clp* (encoding CS31A) expression is strongly repressed by L-alanine and L-leucine. It was previously shown that methylation protection of GATC sites was dependent on Lrp (leucine responsive regulatory protein) and that the binding of Lrp to leucine or alanine could modify the Lrp regulatory action. Gel shift studies on the binding affinity of Lrp were done on the two GATC DNA regions located in the *foo* and *clp* regulatory regions. In the absence of alanine or leucine, no difference in Lrp affinity between the two GATC sites of the *foo* regulatory region was observed. In contrast, for *clp*, Lrp affinity was higher for the GATC<sub>prox</sub> than for GATC<sub>dist</sub> region. Alanine and leucine decreased the affinity of Lrp to both GATC regions of the *foo* and *clp* regulatory regions. For *foo*, the correlation of methylation protection patterns with cells in ON or OFF phase was less defined than for *clp*. Leucine and alanine promoted the GATC methylation pattern characteristic of repressed cells in the *clp* regulatory region (Crost *et al.* 2003) by modifying the Lrp-DNA affinity, whereas the effect of leucine and alanine on the *foo* GATC methylation pattern was less drastic. In the presence of alanine, protection from methylation of both *foo* GATC sites was increased, whereas in the presence of leucine, methylation of both *foo* GATC sites

was increased. Thus differences in alanine and leucine repression are observed in the two fimbrial systems belonging to the Pap regulatory family.

### 3.2. Introduction.

Fimbrial adhesins mediate specific attachment of bacteria to different host cells and tissue sites, thus contributing to the pathogenicity of the bacteria. Fimbrial adhesins are associated with *Escherichia coli* strains that cause intestinal or extra intestinal infections. F165<sub>1</sub> and CS31A are adhesins produced by septicemic *E.coli* from animals, and are encoded by the *foo* and the *clp* operons respectively (Harel *et al.*, 1992b; Martin *et al.*, 1991). F165<sub>1</sub> and CS31A are required for full bacterial virulence (Ngeleka *et al.*, 1993; Ngeleka *et al.*, 1994; Girardeau, personal communication). They belong to the P fimbrial regulatory family. Expression of adhesins belonging to the P-regulatory family is subject to phase variation control (except *fae* encoding K88), defined as the ability of cells to switch in a reversible manner between phase ON cells (transcription) and phase OFF cells (no transcription). Phase variation requires Lrp (leucine-responsive regulatory protein), which directly interacts with a PapI homologue encoded by a gene generally located upstream of the fimbrial operon. Nucleotide targets of Lrp include two GATC sites that are spaced 102 or 103 bp apart upstream of the promoter. The differential methylation status of these sequences determines the binding of Lrp, because Lrp binds only non-methylated GATC sites. PapI or its homologues have the capacity to displace Lrp from a binding site to another (Braaten *et al.*, 1994; Kaltenbach *et al.*, 1995). Lrp activates *foo* basal expression and repress basal *clp* transcription in the absence of phase variation, i.e. in the absence of a PapI homologue in the cells. Phase variation of the *foo* and *clp* operons requires both Lrp and a PapI homologue. FooI is the PapI homologue required for the *foo* transcriptional control (Daigle *et al.*, 2000), whereas the PapI homologue required for regulation of *clp* expression is not yet identified (Martin, 1996). FooI acts as an activator of *foo* transcription (Crost *et al.* submitted) and AfaF (a PapI homologue) acts both as a repressor and as an activator of *clp* transcription (Crost *et al.*, 2003; Martin, 1996). It is well known that the transcriptional action of Lrp can be modified by its interaction with leucine or alanine (Platko et Calvo, 1993). All the possible regulatory patterns in response to Lrp and leucine



have been demonstrated. It has been shown that leucine antagonizes the activating action of Lrp on *ilvIH* and *gltBDF* promoters and its repressive effect on the *lysU* promoter by reducing the affinity of Lrp for its binding sites (Ernsting *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1992b; Ricca *et al.*, 1989). Leucine can also potentiates Lrp action on other operons, by an unknown mechanism. Some other positively or negatively regulated operons are insensitive to leucine. In a number of cases, alanine has been shown to have a similar effect to leucine (Newman and Lin 1995). Expression of all the P-related operons so far studied is insensitive to leucine or alanine, except expression of the *clp* and *foo* operons (Harel et Martin, 1999). Leucine and alanine dramatically reduce CS31A and F165<sub>1</sub> production (Fairbrother *et al.*, 1988; Girardeau *et al.*, 1988). We previously showed that alanine and leucine repress basal *foo* and *clp* transcription in the absence of a PapI homologue. In the presence of a PapI homologue, L-alanine prevents the OFF to ON switch, locking *foo* and *clp* expression in the OFF phase, whereas L-leucine represses transcription without major effects on the switch frequency (Crost *et al.* submitted, Martin, 1996). Analysis of *clp* expression showed that leucine and alanine promote methylation of GATC<sub>dist</sub> (the GATC site distal from the promoter) and methylation protection of GATC<sub>prox</sub> (the GATC site proximal from the promoter), increasing the methylation pattern characteristic of repressed cells. Furthermore, alanine prevents the AfaF-dependent methylation protection of GATC<sub>dist</sub>, and thus the appearance of phase-ON cells. In addition, alanine and leucine also repress *clp* transcription by an Lrp-independent mechanism (Crost *et al.*, 2003). The methylation status of the GATC sites in the regulatory region of the *foo* operon was not studied and it is not known if alanine and leucine repressed *foo* transcription by a methylation-independent mechanism.

In this study, we investigated the effect of leucine and alanine on *clp* and *foo* expression by analyzing (i) the Lrp DNA affinity for the two GATC regulatory regions of *clp* and *foo*, (ii) the effects of both amino acids on the Lrp-DNA binding, (iii) the effect of L-alanine and L-leucine on the methylation patterns of the two GATC sites of the *foo* regulatory region.

### 3.3. Materials and Methods.

#### 3.3.1. Bacterial strains and media.

*E. coli* strains Top10 and XL1 blue were used as recipient in molecular cloning experiments. *E. coli* strain MC4100 (Casadaban, 1976) was used as Lrp<sup>+</sup> host background for recombinant lysogenic  $\lambda$  phages (Table 1). *E. coli* strains MC4100. $\lambda$ 6 contains a single chromosomal copy of a *clpB-lacZYA* fusion (Fig. 1). MC4100. $\lambda$ 01 and MC4100. $\lambda$ 02 are *E. coli* MC4100  $\lambda$  lysogens containing a single copy chromosomal operon fusion *fooB-lacZYA*. MC4100. $\lambda$ 01 is *fooI*<sup>+</sup> and MC4100. $\lambda$ 02 is *fooI*<sup>-</sup> (Crosth et al. submitted).

Luria-Bertani (LB) broth, LB agar, M9 minimal broth and M9 minimal agar were prepared according to Miller (Miller, 1972). Glycerol as carbon source was added at 0.2% (w/v). Supplements, when appropriate, were used at the following concentrations: X-gal, 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; IPTG, 1 mM; amino acids, 5 mM; ampicillin, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; kanamycin, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; streptomycin, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; tetracycline, 17.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . L-isoleucine (0.04 mM) and L-valine (0.06 mM) were added to media containing L-leucine.

#### 3.3.2. Observation of phase variation.

Fusion strains were inoculated onto X-gal M9 glycerol agar supplemented with or lacking 5 mM L-alanine or L-leucine (with addition of L-isoleucine and L-valine). Colonies showing a uniform phenotype (dark blue or white, with no sectors) were resuspended in M9 salts. Appropriate dilutions were spread onto the same medium as the parent colony. After growth, the colonies were scored for a white or blue phenotype. The switch frequencies were calculated using the formula  $(M/N)/g$ , where M is the number of cells that underwent phase transition, N the total number of cells evaluated, and g the number of generations, estimated to be 27, that gave rise to the colony.

### 3.3.3. Statistical analysis.

SPLUS 1999 software (MathSoft Inc.) was used to perform the Wilcoxon test. The average was obtained as the minimum of four independent values. Statistical significance was declared at  $P < 0.05$ . Sigma plot 2000 software (SPSS Science) was used to produce graphs.

### 3.3.4. DNA hybridizations.

For chromosomal MC4100.λ01 DNA purification, a single blue or a single white colony was picked from M9-glycerol-X-Gal agar, resuspended in M9 salts, and used to inoculate three flasks containing the appropriate medium. Isoleucine (0.4 mM) and valine (0.6 mM) were added to the medium containing 5 mM leucine. Chromosomal DNA was isolated from overnight cultures using the DNeasy tissue kit (Qiagen). Aliquots of the cultures used for DNA purification were plated on the corresponding medium to calculate the percentage of ON cells. Digestions with restriction endonucleases *Pst*I and *Hinf*I were performed on genomic DNA of MC4100.λ01 strain, while *Bam*HI and *Hinf*I were used to digest the genomic DNA of MC4100.λ02 strain. After precipitation of the restricted product, a second restriction was performed with *Mbo*I on one half of the product and with *Dpn*I on the other half. All restrictions were performed according to the manufacturer's instructions (Roche). The digoxigenin-labeled DNA molecular weight marker VI (Roche) was used as DNA migration reference. DNA restriction fragments were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel in TBE buffer and transferred to nylon membrane (Hybond N+, Amersham Biotech) in 20x SSC (0.3 M Na-citrate, 0.33 M NaCl, pH 7.0) using a vacuum blotter (Appligène). Transfer was carried out at 45 mbar for 60 min. DNA fragments were crosslinked to the filter with ultraviolet light using the Spectrolinker (Spectronics corporation). The filter was probed with digoxigenin-labeled DNA (240 bp) generated by PCR using the PCR DIG Probe Synthesis kit (Roche) and primers DamF (5'-GAATTTGCTTTTTGTTGGCTTT-3') and DamR (5'-AGACATAGAGCCGGGCAAC-3'). Hybridization was detected by chemiluminescence using CDP-Star (NEN) as a substrate for alkaline phosphatase. Quantification was performed by densitometry analysis

using the Diversity DataBase software from Bio-Rad.

### 3.3.5. Production and purification of Lrp.

The six histidine tagged Lrp was overproduced and purified by Ni-NTAaffinity chromatography from strain CV1494 (generous gift from J. Calvo) as previously described (Matthews *et al.*, 2000). From 1 liter bacterial culture, a volume of 20 ml of 1 mg/ml 6His-Lrp was eluted. However dialysis of the eluate with TG<sub>50</sub>ED 0.1 M NaCl buffer was not performed since it leads each time to precipitation of the 6His-Lrp. Instead, 200 µl of TG<sub>50</sub>ED 0.1 M NaCl were added to each 1ml elution sample. Following migration on denaturing polyacrylamide gel and silver nitrate staining, densitometry analysis using the Diversity DataBase software was performed to quantify 6His-Lrp, with known concentrations of lysosyme as standards.

### 3.3.6. Gel retardation.

DNA-binding reactions for gel retardation were prepared as described (Nou *et al.*, 1993). Six different DNA probes were used in gel retardation experiments. The digoxigenin-labeled DNA probes were generated by PCR using the Taq polymerase of Appligène and the PCR DIG Mix (Roche). Primers used are listed in table 2. PCR amplification program were 94 °C 5 min, thirty cycles (94 °C 30 sec, T<sub>m</sub> 30 sec, 72 °C 30 sec), and 72°C 5 min. Two different T<sub>m</sub> were used to amplified the *foo* and the *clp* DNA fragments : 46 °C (for F<sub>dist</sub>, F<sub>prox</sub> and F<sub>dist-prox</sub>), 48 °C ( for C<sub>dist</sub>, C<sub>prox</sub> and C<sub>dist-prox</sub>), respectively. DNA probes were purified with the strataprep Kit (Stratagen) or with MinElute (Qiagen).

Each binding reaction contained 8 ng of DIG-labeled *foo* DNA or DIG-labeled *clp* DNA fragment, 3 µg of polydIdC-dIdC (Amersham), and the total volume was adjusted to 10-20 µl with binding buffer (60 mM Tris HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 40 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 12.5 % glycerol). A range of six Lrp dimer concentrations (66

nM, 33 nM, 16.5 nM, 11 nM, 8.25 nM, 5.5 nM, 4.125 nM) was tested. When necessary L-alanine or L-leucine were added to the binding reaction before adding Lrp. The reaction mixture was incubated at 4°C for 15 min and then loaded onto a 4 % acrylamide non denaturing gel (1 X TBE, 2.5 % glycerol). The digoxigenin-labeled DNA molecular weight marker V (Roche) was used as DNA migration reference. Electrophoresis was carried out at 180 V for 50 min at 4°C. DNA was then transferred onto a nylon membrane (positively charged nylon membrane, Roche) and detection was performed with ECF western blot detection reagent according to the manufacturer's instructions (Amersham). Detection of 6His-Lrp in shifted DNA bands was performed using an anti-poly histidine conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) after Western blot on nitrocellulose membrane (Biorad) with ECF Western blot detection reagent. Fluorescence was then scanned using the Image Quant software (Molecular Dynamics). Quantification of bound Lrp was performed by comparison of known Lrp concentrations. Quantification was performed by densitometry analysis using the Diversity DataBase software from Bio-Rad. The Lrp dissociation constant,  $K_d$ , is the Lrp concentration required to bind 50 % of the DNA, the Lrp affinity constant is  $1/K_d$ . Calculation of the degree of cooperativity was performed as described by (Carey, 1991) : Degree of cooperativity =  $\text{Log}_{10} (\text{Lrp concentration for 90 \% of DNA bound}) - \text{Log}_{10} (\text{Lrp concentration for 10 \% of DNA bound})$ . Values = 1.81 Log unit indicate no cooperativity during the binding reaction. Values < 1.81 Log indicate a positive cooperativity. Values > 1.81 Log indicate a negative cooperativity.

### 3.4. Results.

#### 3.4.1. Gel retardation.

Lrp affinity for the *clp* and *foo* regulatory regions was analyzed by gel retardation experiments using purified 6His-Lrp. The target fragments were chosen based on the comparison of the regulatory regions of the *pap*, *clp*, and *foo* operons (Fig. 2). As *foo* and *pap* regulatory regions are highly homologous (98 %) and that they share common transcriptional regulation features, we hypothesize that the six Lrp binding sites demonstrated in the *pap* regulatory region were the same in the *foo* regulatory region (Nou *et al.* 1995, Daigle *et al.* 2000). In *pap* regulatory region, Lrp showed a greatest affinity for

sites 1, 2, 3 (GATC proximal region) than for sites 4, 5, 6 (GATC distal region) (Nou *et al.* 1995).

For all the following gel shift experiments, we performed Western blot analysis to confirmed that Lrp was associated with each DNA shifted band (Fig. 3).

Analysis of Lrp binding to the  $C_{\text{dist-prox}}$  (*clp*) and  $F_{\text{dist-prox}}$  (*foo*) DNA fragments containing the two GATC regions, revealed that Lrp dissociation constant,  $K_d$ , is nearly similar for both fragments: 12 nM and 11.5 nM, respectively. A rapid apparition of different retarded bands is observed with increasing concentration of Lrp : the lower molecular weight bands disappeared and the higher molecular weight bands amount increased. Thus, Lrp appeared to bind to  $C_{\text{dist-prox}}$  and  $F_{\text{dist-prox}}$  in a multicomplex manner. Both DNA fragments shifted first into a high affinity complex (lower bands), then into one or two low-affinity complexes (higher molecular weight bands) (Fig. 3 and Fig. 4). The cooperativity value of Lrp binding to  $C_{\text{dist-prox}}$  and  $F_{\text{dist-prox}}$  is less then 1.81 Log unit (0.9 Log) indicating positive cooperative binding.

Lrp affinity was then analyzed using DNA fragments containing either  $\text{GATC}_{\text{dist}}$  or  $\text{GATC}_{\text{prox}}$  at the same concentration range of Lrp tested for  $C_{\text{dist-prox}}$  and  $F_{\text{dist-prox}}$  DNA fragments. Lrp bound  $C_{\text{prox}}$ ,  $C_{\text{dist}}$ ,  $F_{\text{prox}}$  and  $F_{\text{dist}}$  in a single affinity complex, since only one shifted band was observed at all Lrp concentrations tested (data not shown).

At 66 nM of Lrp dimers, 100 % of all the DNA fragments were shifted at the exception of  $C_{\text{dist}}$  that showed only 40 % of shifted DNA (Fig. 4). Analysis of Lrp binding to the  $C_{\text{prox}}$ ,  $C_{\text{dist}}$  and  $C_{\text{dist-prox}}$  DNA fragments showed that Lrp  $K_d$  for  $C_{\text{dist}}$  (> to 70 nM) is superior to Lrp  $K_d$  for  $C_{\text{prox}}$  (39 nM) and for the  $C_{\text{dist-prox}}$  fragment (12 nM). As for *pap*, Lrp binds more efficiently to  $C_{\text{prox}}$  than to  $C_{\text{dist}}$  (Fig. 4). Analysis of Lrp binding to the  $F_{\text{dist}}$ ,  $F_{\text{prox}}$  and  $F_{\text{dist-prox}}$  DNA fragments revealed that Lrp  $K_d$  (11.5 nM) is identical for all three fragments. In contrast to *pap* and *clp* DNA, Lrp showed the same affinity for the  $F_{\text{prox}}$  and  $F_{\text{dist}}$  DNA fragments.

In order to analyze the effect of alanine or leucine on Lrp-DNA interactions, we performed gel shift experiments in the presence of increasing concentrations of these amino acids (0 to 20 mM). A Lrp-DNA ratio of 66 nM / 8 ng leading to 100% of bound DNA (except for  $C_{\text{dist}}$ ) was used in all experiments. Alanine and leucine decreased Lrp binding to each fragment, as a function of the amino acid concentration (Fig. 5).

At low amino acid concentrations, Lrp binding to  $C_{\text{dist-prox}}$  and  $C_{\text{prox}}$  fragments showed similar curve, but a stronger decrease of bound  $C_{\text{prox}}$  amount was observed following addition of 10 mM of alanine (Fig. 5A) and 2.5 mM of leucine and (Fig. 5B). The binding of Lrp to  $C_{\text{dist}}$  was more sensitive to both amino acids than the Lrp binding to  $C_{\text{dist-prox}}$  and  $C_{\text{prox}}$  fragments. A fifteen percent Lrp binding decrease was observed at 0.5 mM of alanine and at 1 mM of leucine for  $C_{\text{dist}}$ .

Lrp binding to  $F_{\text{dist-prox}}$ ,  $F_{\text{prox}}$  and  $F_{\text{dist}}$  fragments showed similar curved in presence of both amino acids. A clear Lrp binding decrease was observed at 5 mM of alanine and leucine for each *foo* DNA fragment (Fig. 5C-D).

### 3.4.2. Methylation pattern of *foo* DNA.

In order to determine if the methylation pattern of the *foo* regulatory region could be correlated with the ON/OFF transcriptional phases, we performed Southern analyses on chromosomal DNA of lysogenic strains. Strain MC4100.λ01 contains the *lacZ* reporter gene under the *fooB* promoter control and the divergent *fooI* regulatory gene (Table 1, Fig. 1) (Crost *et al.* submitted). Single colonies cultured on M9-glycerol-X-Gal were used to inoculate M9-glycerol supplemented or not with leucine or alanine. Inoculation was done with either a Lac<sup>+</sup> or a Lac<sup>-</sup> colony. The corresponding percentage of phase-ON cells was calculated. DNA was digested with *DpnI*, which only cuts methylated GATC sites, or *MboI*, which only cuts non-methylated GATC sites, and hybridized with a digoxigenin DNA probe that encompasses the two GATC sites (Fig. 6). In vitro addition of Lrp to *pap* DNA and methylation pattern analysis of *pap* regulatory region showed that when a GATC site is bound by Lrp it blocks its methylation and when a GATC site is methylated it is not bound by Lrp (Braaten *et al.*, 1991; Nou *et al.*, 1993; van der Woude *et al.*, 1998). Since regulatory region of *pap* and *foo* are highly homologous and that in an Lrp- background, both *pap* and *foo* expression are abrogated, we hypothesized that Lrp also protects *foo* GATC sites from methylation and the reverse is true (Crost *et al.* submitted, (van der Woude *et al.*, 1995). In M9 medium, the four different methylation patterns were observed, whatever the starting colony phenotype (Lac<sup>+</sup> / Lac<sup>-</sup>). In spite of a very high percentage of Lac<sup>+</sup> bacteria in Lac<sup>+</sup> and Lac<sup>-</sup> colonies (99 % and 85 % respectively), none of these

methylation patterns appeared largely predominant (Table 3). Therefore it was not possible to correlate the phase ON with a particular methylation status of the regulatory region. However, in Lac<sup>-</sup> colonies, the percentage of DNA molecules with only GATC<sub>prox</sub> methylated decreased while the percentage of DNA molecules with only GATC<sub>dist</sub> methylated and fully non-methylated increased. In order to investigate the action of FooI on GATC methylation patterns, we compared the Southern analyses performed on chromosomal DNA of strains MC4100.λ01 with those of MC4100.λ02, the *fooI*- derivative (Table 1, Fig. 1). MC4100.λ02 cells presented a uniform pale blue phenotype. The four different methylation patterns were also observed for this strain, but with a different percentage. When FooI was present, the percentage of fully methylated DNA decreased at the benefit of DNA molecules with only GATC<sub>prox</sub> methylated. Thus, by analogy with *pap*, FooI appeared to favor Lrp binding to GATC<sub>dist</sub>.

In the three media tested and the two strains used, the four different methylation patterns were again observed in all cases, but their relative amounts varied regarding to the strains and the media tested. In the presence of L-alanine, in FooI<sup>-</sup> and FooI<sup>+</sup> strains, protection from methylation of both GATC sites was increased and both amount of patterns single GATC site methylated were decreased (Table 3). An increased protection from methylation of GATC<sub>dist</sub> was observed in the presence of FooI compared to the FooI<sup>-</sup> strain, regardless of the presence or absence of alanine.

In contrast with the protection from methylation observed with alanine, L-leucine increased the methylation of both GATC sites compared to M9 medium and slightly decreased the protection from methylation of GATC<sub>prox</sub> and GATC<sub>dist</sub> (Table 3). An increased methylation of GATC<sub>dist</sub> was observed in the presence of FooI compared to the FooI<sup>-</sup> strain, regardless of the presence or absence of leucine.

### 3.5. Discussion.

F165<sub>1</sub> and CS31A, encoded by the *foo* and *clp* operons respectively, belong to the P-regulatory family of adhesin. Expression of *foo* and *clp*, is subject to a tight control at the transcriptional level, mediated by the global regulator Lrp, as well as by two specific regulators, PapB homologue and a PapI homologue, and, in contrast to *pap*, is dramatically repressed by L-leucine and L-alanine. Leucine bound to Lrp modulates the expression of a



number of operons by altering the affinity of Lrp for its target sites. In this study, we investigated the mechanism of leucine and alanine action on the Lrp binding to the regulatory regions of *clp* and *foo* operons.

### 3.5.1. Effect of alanine and leucine on the Lrp affinity for *clp* DNA.

Here we demonstrate that without AfaF and Dam methylation, Lrp binds in a multicomplex manner the C<sub>dist-prox</sub> DNA fragment. This is probably due to the different Lrp affinity for the two GATC regions, as Lrp shows less affinity for GATC<sub>dist</sub> region than GATC<sub>prox</sub> region in gel retardation assay. It was previously shown, *in vivo*, that Lrp presents a lower affinity for GATC<sub>dist</sub> site than for GATC<sub>prox</sub> site, that methylation protection of GATC<sub>prox</sub> site requires Lrp and that methylation protection of GATC<sub>dist</sub> by Lrp appears only in the presence of AfaF, the PapI homologue (Crosth et al., 2003). *In vitro*, Lrp binds GATC<sub>dist</sub> region without presence of AfaF, probably because there is no competition with Dam for this site in gel shift assay. Furthermore, *in vivo*, Lrp affinity for GATC<sub>dist</sub> is too low to compete with Dam. This indicates that AfaF is required to increase the Lrp DNA affinity for GATC<sub>dist</sub> and to allow the phase OFF (GATC<sub>dist</sub> methylated and GATC<sub>prox</sub> protected) to ON (GATC<sub>prox</sub> methylated and GATC<sub>dist</sub> protected) transition.

Here we observed that *in vitro*, both alanine and leucine decrease Lrp binding to DNA containing either the two GATC regions or a single GATC region. Moreover, Lrp binding to the GATC distal region is more sensitive to alanine (1 mM) and leucine (1 mM) than Lrp binding to the GATC proximal region (clear decrease at 10 mM of alanine and 5 mM of leucine). As Lrp binds with more affinity the DNA fragment containing both GATC regions than the GATC<sub>prox</sub> region than the GATC<sub>dist</sub> region, GATC<sub>dist</sub> region is more sensitive to the negative effects of both amino acids on Lrp binding. It is possible that a positive cooperativity between the two GATC regions antagonize the alanine and leucine effect on the C<sub>dist-prox</sub> fragment. Those results do not correlate with the *in vivo* methylation study, where leucine lowers and alanine prevents Lrp binding to GATC<sub>dist</sub>. and alanine acts in conjunction with AfaF to increase Lrp binding to GATC<sub>prox</sub>, so that cells are locked in a highly repressed OFF phase (Crosth et al., 2003). Lrp interaction with GATC<sub>dist</sub> is sensitive

to alanine and extensively to leucine, and Lrp interaction with GATC<sub>prox</sub> is more resistant to alanine and leucine. It has been recently shown that Lrp self-associates *in vitro* to a hexadecamer and octamer and that leucine induces dissociation of the Lrp hexadecamer to octamers (Chen *et al.*, 2001). It might be that octamers are not able to bind GATC<sub>dist</sub> but still can bind GATC<sub>prox</sub>.

### 3.5.2. Effect of alanine and leucine on the Lrp-DNA binding and on methylation of GATC sites of *foo* DNA.

*In vitro* results of Lrp affinity study for the two GATC regions showed that in contrast to *pap* and *clp*, Lrp has the same affinity for both GATC regions, whereas the methylation study showed that in absence of FooI, Lrp has more affinity for GATC<sub>prox</sub> than GATC<sub>dist</sub>. As in the gel shift assay, there is no competition between Lrp and Dam for the GATC sites, this could explained the different results observed in the methylation pattern study.

Analysis of methylation patterns revealed that the four methylation patterns were observed regardless of FooI presence. In contrast to *pap* and *clp* operons (Blyn *et al.*, 1990; Crost *et al.*, 2003), no pattern can be related with the ON or OFF phase variation phenotype. We also observed that, in contrast to *pap* and *clp* phase variation, *foo* expression is submitted to an extremely rapid switch frequency and is mainly in ON phase (Crost *et al* submitted). In *pap* intergenic region, six Lrp binding sites were found, with different Lrp's affinity leading to two regions. If the phase variation mechanism of *foo* is similar to the *pap* and *clp* mechanism : in phase OFF cells, Lrp would bind the GATC proximal region and in phase ON cells, Lrp would bind the GATC distal region with the help of FooI, the PapI homologue. Thus, the equivalent Lrp affinity for both GATC regions could explained the phase ON predominance and the higher switch rate observed *in vivo* for the *foo* expression since, in absence of FooI, Lrp can already bind the distal region and since, in presence of FooI, equivalent percentage of phase ON and OFF methylation pattern are observed. However, the two other methylation pattern are still observed : both GATC sites methylation and both GTAC sites non-methylation. The binding of Lrp to the two GATC sites might be not essential for the phase variation control of *foo* operon, but the other Lrp

binding sites contained in the GATC regions would be essential. The *foo* intergenic region contains the six potential binding sites for Lrp at the same place than in the *pap* regulatory region and highly conserved. However two sites show one nucleotide difference from the corresponding site on *pap* DNA (sites 4 and 1) (Daigle *et al.*, 2000; Nou *et al.*, 1995). Nou *et al.* have shown that one nucleotide mutation in site 3 locked in phase-ON the *pap* operon and a substitution in site 1 increased the OFF to ON switch rate (Nou *et al.*, 1995). Few other nucleotide change are also present between the Lrp binding sites. Differential protein-DNA binding affinity is regulated by the intrinsic structure and deformability encoded in the base sequence of the DNA target, a simple modification of only two nucleotides in a binding sequence is sufficient to alter binding affinity of E2 regulatory protein (Hizver 2001 PNAS). It is possible that the nucleotide modifications of sites 4 and 1 explain the same Lrp affinity for both GATC regions. Footprinting experiments will be necessary to resolve this point. Another difference is that the PapI and FooI protein differ from one amino acid, position 17 (Asp to Asn), this probably resulting in a fewest affinity for Lrp-DNA complex or a fewest influence on the Lrp conformation modification that could also be responsible for the switch frequency rate differences between *pap* and *foo* operons (Daigle *et al.*, 2000).

Upon addition of leucine, methylation of both GATC sites was increased *in vivo*. Effect of leucine on Lrp-DNA binding are consistent with this result, since leucine inhibited Lrp attachment to both GATC regions. In presence of alanine the methylation pattern was altered in an opposite way to leucine effect : protection from methylation of both GATC sites was increased. This is in contrast with gel retardation assay where binding of Lrp to both GATC regions was decreased in presence of alanine. Phenotype colony results indicated that in presence of alanine, cells seemed to be locked in phase-OFF, whereas in presence of leucine, no change in phase variation was observed. The addition of alanine or leucine modified in the same way the methylation pattern observed in the absence or in the presence of FooI. Thus, those amino acids did not modify the FooI action. This is in contrast with the alanine and leucine effect on the *clp* expression. For *clp*, alanine avoided and leucine lowered Lrp binding to GATC<sub>dist</sub> thus antagonize AfaF action. Furthermore, alanine acted in conjunction with AfaF to increase Lrp binding to GATC<sub>prox</sub>, so that cells were locked in a highly repressed OFF phase (Crost *et al.*, 2003). Even if methylation analysis of *foo* regulatory region is not conclusive, it is noteworthy that in gel retardation

assay, alanine decreased more easily Lrp binding to GATC distal region (2.5 mM alanine) than to GATC proximal region (10 mM alanine) in absence of FooI. Maybe that alanine only prevents binding of Lrp to the non GATC Lrp binding sites whereas leucine can alter Lrp binding to all DNA sites in the *foo* regulatory region. Since leucine induces dissociation of the Lrp hexadecamer to octamers it is possible that alanine does the same (Chen *et al.*, 2001). Maybe that alanine bound octamers are not able to bind the GATC distal region but still can bind the GATC proximal region, whereas leucine bound octamers interact with both GATC DNA regions with the same affinity. The repressive effect of alanine and leucine could also be due to a mechanism unrelated to Lrp action, as in the *clp* operon transcriptional regulation (Croast *et al.*, 2003).

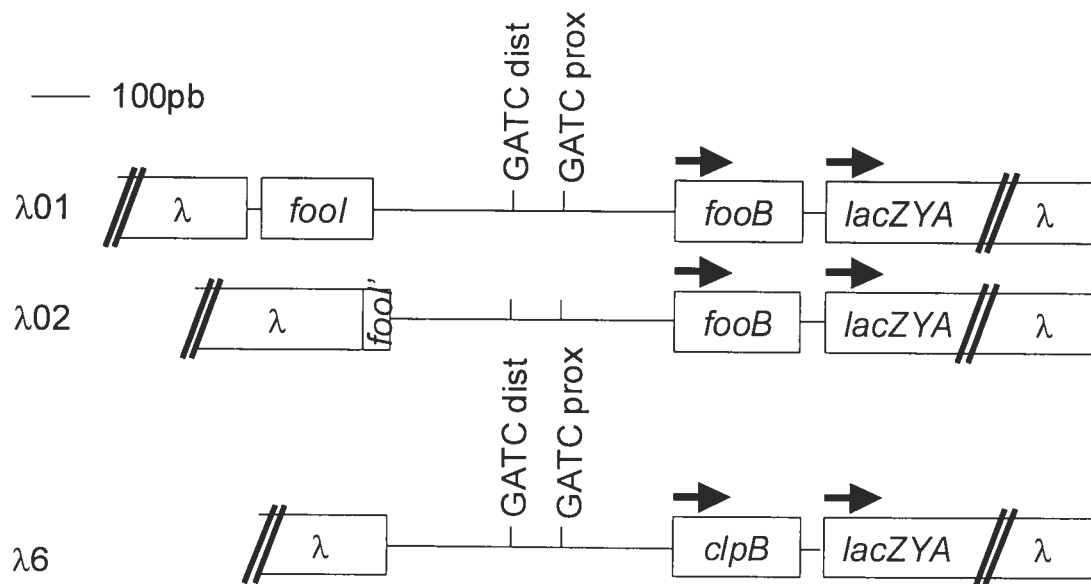
In conclusion, the phase variation mechanism of the *foo* promoter showed some difference with the *pap* and *clp* regulatory mechanism since the Lrp affinity for the *foo* regulatory region is similar between the two GATC DNA regions. Phase variation mechanism of the *clp* promoter is very similar to the mechanism regulating the *pap* expression but showed a sensibility to alanine and leucine probably due in part by the difference of DNA Lrp binding sites in the two regulatory regions. This difference leading to a more sensitive Lrp-DNA binding to alanine and leucine for the *clp* regulatory region than for the *pap* regulatory region.

### **3.6. Acknowledgements.**

We grateful to Aurélie Caille for technical support and Joe Calvo who provides us the strain CV1494. This work was supported in part by le département de santé animale de l'Institut National de Recherche Agronomique, and by a grant (Grant OGP0025120) to J.H. from the natural Sciences and Engineering research Council of Canada and grant 0214 from the Formation de Chercheurs et Aide à la Recherche.

<i>E. coli</i> strains, Plasmids, or Bacteriophage	Description	Reference
<i>E. coli</i> MC4100 DL844	F <sup>+</sup> ara D139 Δ( <i>lac</i> IPOZYA- <i>arg</i> F)U169 <i>rps</i> L <i>thi</i> -1 MC4100 <i>mbf</i> -20	Casadaban (1976) Braaten <i>et al.</i> (1994)
Top10	F <sup>+</sup> <i>mcr</i> A Δ( <i>mrr</i> - <i>hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) φ80 <i>lac</i> ZΔM15 Δ <i>lac</i> X74 <i>deo</i> R <i>rec</i> A1 <i>ara</i> D139 Δ( <i>ara</i> - <i>leu</i> )7697 <i>gal</i> U <i>gal</i> K <i>rps</i> L(Str <sup>R</sup> ) <i>end</i> A1 <i>nup</i> G <i>rec</i> A1 <i>end</i> A1 <i>gyr</i> A96 <i>thi</i> -1 <i>hsd</i> R17 <i>sup</i> E44 <i>rel</i> A1 <i>lac</i> (F'	Grant <i>et al.</i> (1990)
XL1 blue MC4100.λ01 MC4100.λ02 MC4100.λ6	<i>pro</i> AB <i>lac</i> I <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(Tet <sup>r</sup> ) MC4100-λ01( <i>foo</i> l positive <i>foo</i> B- <i>lac</i> ZYA) MC4100-λ02 ( <i>foo</i> l negative <i>foo</i> B- <i>lac</i> ZYA) MC4100-λ6 ( <i>clp</i> B- <i>lac</i> ZYA)	Stratagene Croft <i>et al.</i> submitted Croft <i>et al.</i> submitted Martin 1996
Plasmids pRS551 pGEM-T ptrf1	<i>amp</i> - <i>kan</i> - <i>lac</i> ZYA pMB1 replicon  ptrc99A- <i>afa</i> F	Simons <i>et al.</i> (1987) Promega Martin 1996
Bacteriophage λRS45 λ01 λ02 λ6	<i>amp</i> '- <i>lac</i> ZYA <i>imm</i> <sup>21</sup> λRS45-pMT01 recombinant phage λRS45-pMT02 recombinant phage λRS45-pPG6	Simons <i>et al.</i> (1987) Croft <i>et al.</i> submitted Croft <i>et al.</i> submitted Martin 1996

**Table 1** : Strain, plasmids and bacteriophages description.

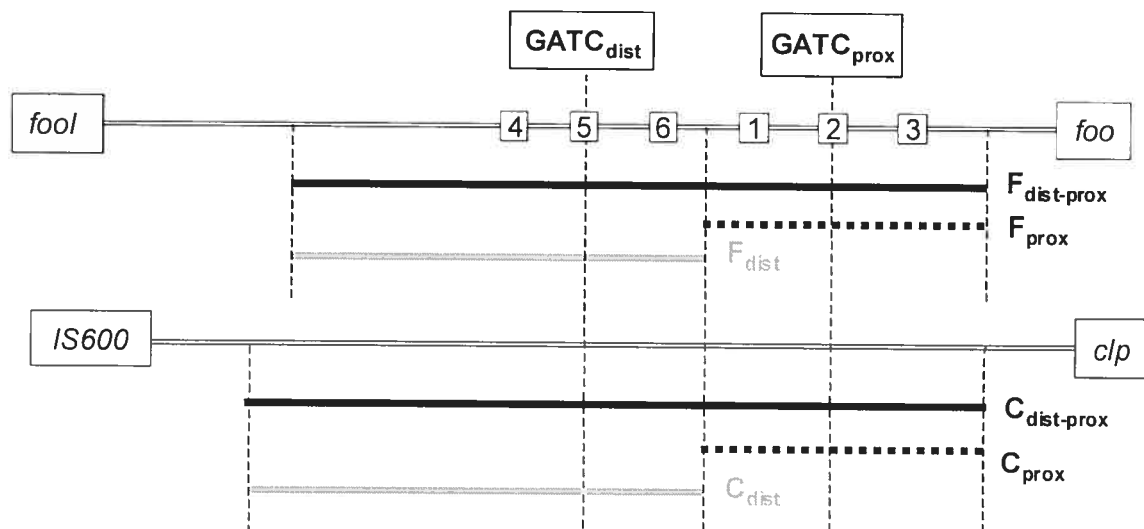


**Fig. 1** : Physical maps of single-copy *foo*B-*lac*ZYA and *clp*B-*lac*ZYA fusions.

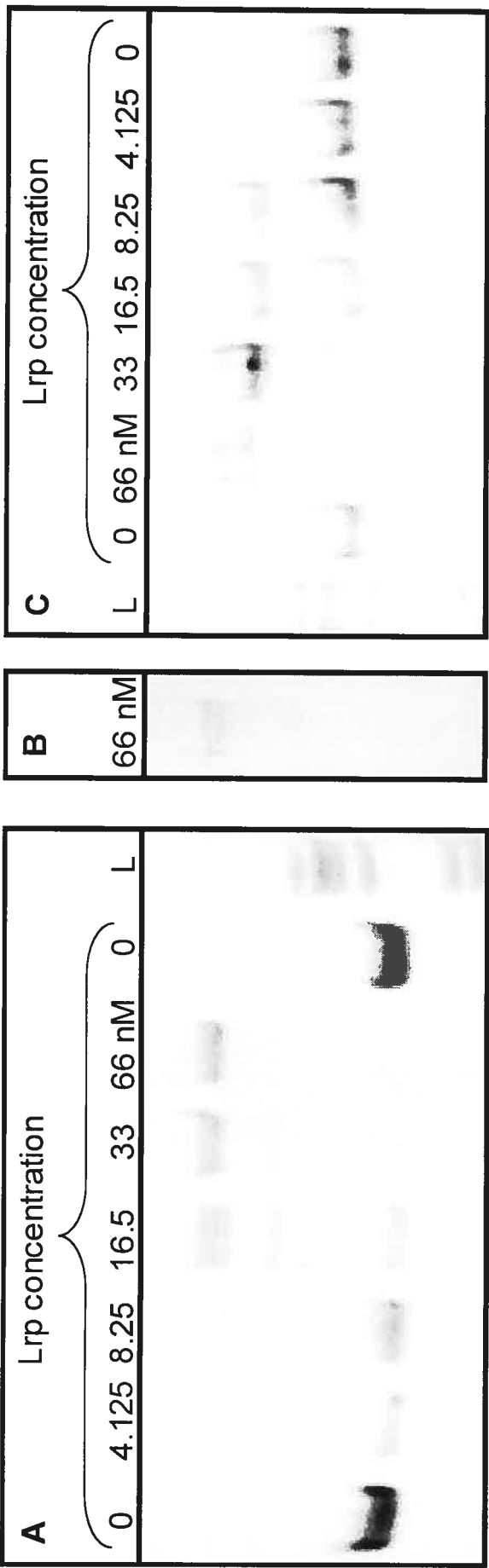
Open boxes indicate the positions of genes and λ sequences. GATC sites distal and proximal are shown.

Primers name	Sequence 5'- 3'	
FooDI	gtatttgctttatttgcg	
FooG1	caaacaacaagaatacac	
FooG2	gtgtattcttggtgttg	
FooUB	tactcttcacgcaataag	
ClpD	ctgcagcgaagattatc	
ClpG1	caacagcaaaagccacc	
ClpG2	ggtggcttttgctgttg	
ClpUB	cctgtttgatttcgtgc	
Primers combination	DNA fragment obtained	Size in bp
FooUB + FooG2	Fprox	117
FooDI + FooG1	Fdist	181
FooUB + FooDI	Fdist-prox	280
ClpD + ClpG2	Cprox	125
ClpUB + ClpG1	Cdist	189
ClpUB + ClpD	Cdist-prox	297

**Table 2:** Primers and their combination used for synthesis of digoxigenin labeled DNA fragments.

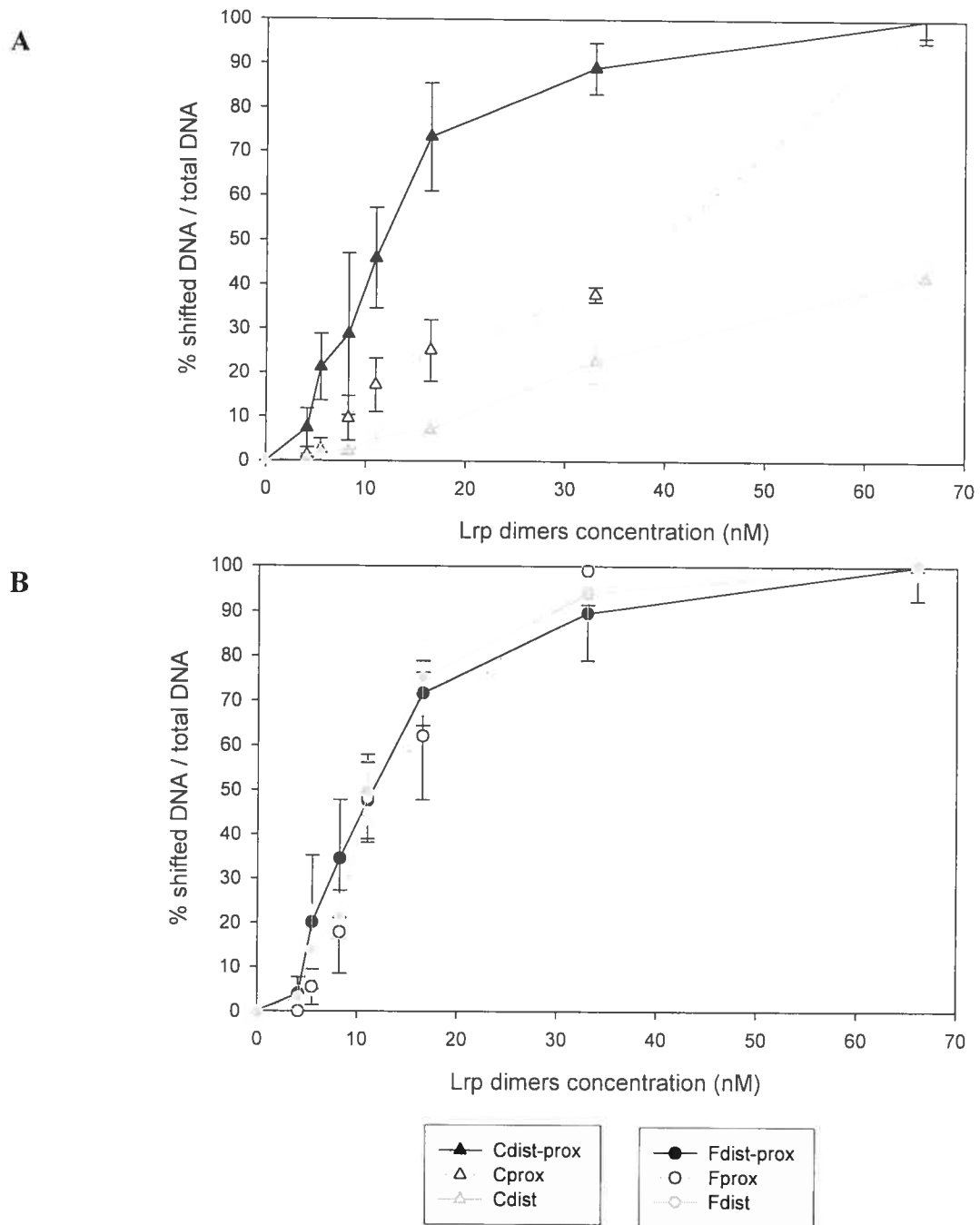


**Fig. 2 :** Schematic representation of DNA fragments used in gel shift. In double line regulatory region of *foo* or *clp* operons. Open squares, the six potential Lrp binding sites of the *foo* regulatory region, deduced from nucleotidic comparison with *pap* regulatory region.



**Fig. 3:** Gel shift experiments with  $F_{\text{dist-prox}}$  fragment.

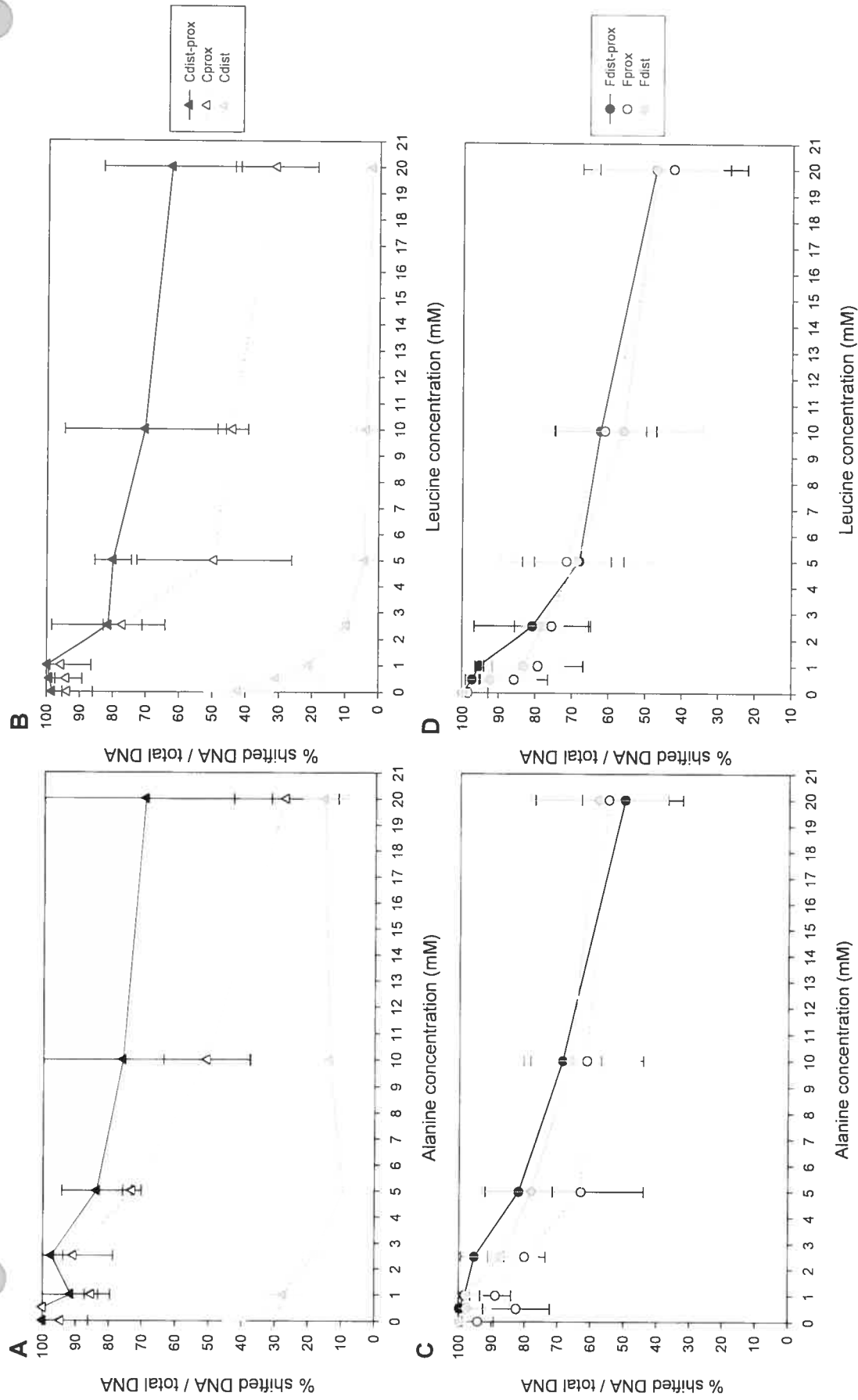
(A) Southern blot of  $F_{\text{dist-prox}}$ , DNA detection with anti-DIG (Roche). Eight ng of DNA was used in each well. On the left, DIG Ladder V (Roche) indicated by L. (B) Western blot, 6His-Lrp detection with anti-polyHis (Sigma). (C) Southern blot of  $C_{\text{dist-prox}}$ , DNA detection with anti-DIG (Roche). The same ladder and DNA amount as used in A.



**Fig. 4** : Lrp affinity for *foo* or *clp* DNAs.

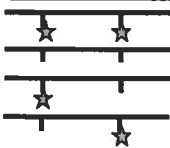

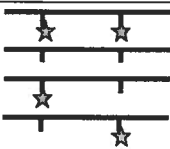


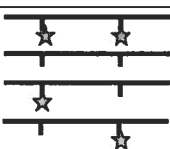
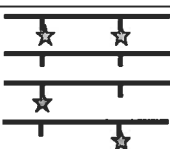
(A)  $C_{\text{dist-prox}}$ ,  $C_{\text{prox}}$  and  $C_{\text{dist}}$  are *clp* DNAs. (B)  $F_{\text{dist-prox}}$ ,  $F_{\text{prox}}$  and  $F_{\text{dist}}$  are *foo* DNAs. DNAs fragment  $F_{\text{dist}}$  and  $C_{\text{dist}}$  contain the GATC distal region, DNA fragments  $F_{\text{prox}}$  and  $C_{\text{prox}}$  contain the GATC proximal region, DNA  $F_{\text{dist-prox}}$  and  $C_{\text{dist-prox}}$  contain both GATC region. In absence of Lrp there is 100 % free DNA. Percentage of shifted DNA were obtained by densitometric analysis with Gel-Doc of Biorad. Values were obtained from minimum three independent experiments.





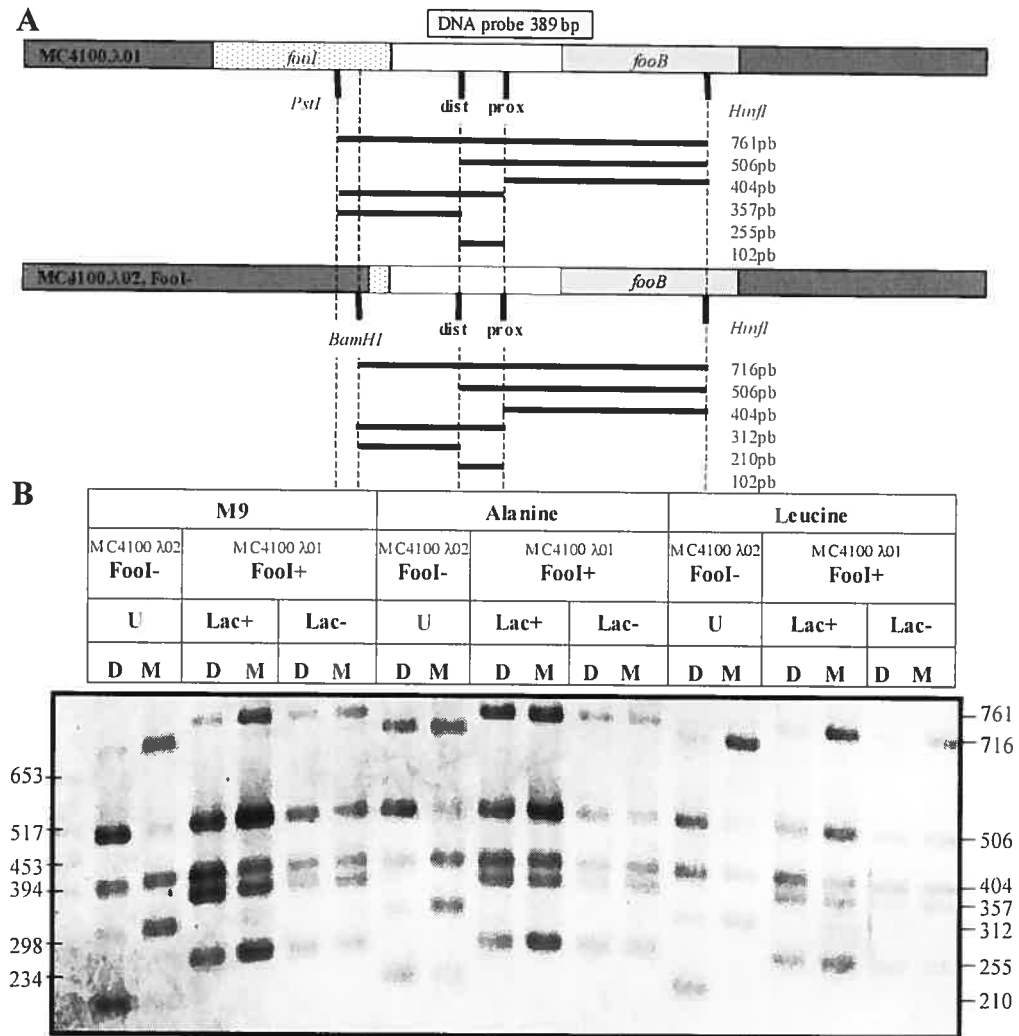
**Fig. 5 :** Lrp affinity for *foo* or *clp* DNAs, in presence of alanine or leucine.

(A-B) C<sub>dist-prox</sub>, C<sub>prox</sub> and C<sub>dist</sub>, are *clp* DNAs. (A-C) Alanine effect. (B-D) Leucine effect. (C-D) F<sub>dist-prox</sub>, F<sub>prox</sub> and F<sub>dist</sub> are *foo* DNAs. For all experiments 66 nM Lrp was used. Percentage of shifted DNA were obtained by densitometric analysis with Gel-Doc of Biorad. Values were obtained from minimum three independent experiments.

Starting colony Growth medium	Methylation pattern	% DNA molecules	% Lac+ cells
FooI+, Lac+ M9 glycerol		19 2 35.5 43.5	99
FooI+, Lac- M9 glycerol		22.8 13.4 42.4 21.4	85
FooI+, Lac+ M9 glycerol + alanine		22.8 24.5 27.5 25.2	0
FooI+, Lac+ M9 glycerol + leucine		31.4 8.1 25.5 35	99
FooI- M9 glycerol		38.7 5.9 47.7 7.7	NA
FooI- M9 glycerol + alanine		32.1 29.2 35.8 2.9	NA
FooI- M9 glycerol + leucine		66 10.1 15.1 8.8	NA

**Table 3** : Methylation pattern of the *foo* regulatory region.

Strains used are MC4100.λ01 (FooI+) and MC4100.λ02 (FooI-). Media containing leucine are supplemented with 0.4 mM isoleucine and 0.6mM valine. Stars indicate methylation of GATC site. NA, not applicable.



**Fig. 6** : Analysis of the *in vivo* GATC methylation states of the *foo* regulatory region.

(A) Schematic representation of DNA fragments that may hybridize with the probe. (B) Southern blot of chromosomal DNA obtained from MC4100.λ02 and MC4100.λ01 and digested with restriction enzymes as described in experimental procedures. Each restricted DNA was then separated in two aliquots which were then digested with a second restriction enzyme *DpnI* (D) or *MboI* (M). Media and strains tested are indicated over the corresponding DNA bands. Phenotype of the colony used to inoculate each medium is also indicated, as strain MC4100.λ02 didn't performed phase variation the uniform colony phenotype was indicated as U. DNA fragment identities (locations and size) were assigned based on known restriction endonuclease sites determined by DNA sequence analysis and by comparing migration to the digoxigenin-labeled DNA molecular weight marker VI, of Roche indicated on the left (Daigle *et al.* 2000). Size of DNA fragments that hybridized with the probe are shown on the right.

### 3.7. References.

- Blyn, L.B., Braaten, B.A., and Low, D.A. (1990) Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential *dam* methylation states. *EMBO Journal* **9**: 4045-4054.
- Braaten, B.A., Blyn, L.B., Skinner, B.S., and Low, D.A. (1991) Evidence for a methylation-blocking factor (*mbf*) locus involved in *pap* pilus expression and phase variation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **173**: 1789-1800.
- Braaten, B.A., Nou, X., Kaltenbach, L.S., and Low, D.A. (1994) Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**: 577-588.
- Carey, J. (1991) Gel retardation. In *Methods in Enzymology*. Vol. 208: Academic press, inc., pp. 103-117.
- Casadaban (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage Lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology* **104**: 541-555.
- Chen, S., Rosner, M.H., and Calvo, J.M. (2001) Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (LRP) from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **312**: 625-635.
- Crost, C., Garrivier, A., Harel, J., and Martin, C. (2003) Leucine-responsive regulatory protein-mediated repression of *clp* (encoding CS31A) expression by L-leucine and L-alanine in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **185**: 1886-1894.
- Daigle, F., Forget, C., Martin, C., Drolet, M., Tessier, M.C., Dezfoulian, H., and Harel, J. (2000) Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Research in Microbiology* **151**: 1-12.
- Ernsting, B.R., Denninger, J.W., Blumenthal, R.M., and Matthews, R.G. (1993) Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: How is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? *Journal of Bacteriology* **175**: 7160-7169.
- Fairbrother, J.M., Lallier, R., Leblanc, L., Jacques, M., and Larivière, S. (1988) Production and purification of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165. *FEMS Microbiology Letters* **56**: 247-252.

- Girardeau, J., Der Vartanian, M., Ollier, J., and Contrepois, M. (1988) CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity* **56**: 2180-2188.
- Harel, J., Forget, C., Saint-Amand, J., Daigle, F., Dubreuil, D., Jacques, M., and Fairbrother, J. (1992) Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165(1), a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicemic *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **138**: 1495-1502.
- Harel, J., and Martin, C. (1999) Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Research* **30**: 131-155.
- Kaltenbach, L.S., Braaten, B.A., and Low, D.A. (1995) Specific binding of PapI to Lrp-pap DNA complexes. *Journal of Bacteriology* **177**: 6449-6455.
- Lin, R., Ernsting, B., Hirshfield, I.N., Matthews, R.G., Neidhart, F.C., R.L., C., and Newman, E.B. (1992) The *lrp* gene product regulates expression of *lysU* in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **174**: 2779-2784.
- Martin, C., Boeuf, C., and Bousquet, F. (1991) *Escherichia coli* CS31A fimbriae: molecular cloning, expression and homology with the K88 determinant. *Microbial Pathogenesis* **10**: 429-442.
- Martin, C. (1996) The *clp* (CS31A) operon is negatively controlled by Lrp, ClpB, and L-alanine at the transcriptional level. *Molecular Microbiology* **21**: 281-292.
- Matthews, R.G., Cui, Y., Friedberg, D., and Calvo, J. (2000) Wild-type and hexahistidine-tagged derivatives of leucine-responsive regulatory protein from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* **324**: 322-329.
- Miller, J.F. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press,.
- Ngeleka, M., Jacques, M., Martineau-Doizé, B., Daigle, F., Harel, J., and Fairbrother, J.M. (1993) Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165<sub>1</sub> fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. *Infection and Immunity* **61**: 836-843.
- Ngeleka, M., Martineau-Doizé, B., and Fairbrother, J.M. (1994) Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K"V165" F165<sub>1</sub> resists killing by porcine polymorphonuclear leukocytes in vitro: role of F165<sub>1</sub> fimbriae and K"V165" O-antigen capsule. *Infection and Immunity* **62**: 398-404.

- Nou, X., Skinner, B., Braaten, B., Blyn, L., Hirsch, D., and Low, D. (1993) Regulation of pyelonephritis-associated pili phase-variation in *Escherichia coli*: binding of the PapI and the Lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation. *Molecular Microbiology* **7**: 545-553.
- Nou, X., Braaten, B., Kaltenbach, L., and Low, D.A. (1995) Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. *EMBO journal* **14**: 5785-5797.
- Platko, J.V., and Calvo, J.M. (1993) Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. *Journal of Bacteriology* **175**: 1110-1117.
- Ricca, E., Aker, D.A., and Calvo, J. (1989) A protein that binds to the regulatory region of the *Escherichia coli* *ilvIH* operon. *Journal of Bacteriology* **171**: 1658-1664.
- van der Woude, M., Bradley Hale, W., and Low, D.A. (1998) Formation of DNA methylation patterns: nonmethylated GATC sequences in *gut* and *pap* operons. *Journal of Bacteriology* **180**: 5913-5920.
- van der Woude, M.W., Kaltenbach, L.S., and Low, D.A. (1995) Leucine-responsive regulatory protein plays dual roles as both an activator and a repressor of the *Escherichia coli* *pap* fimbrial operon. *Molecular Microbiology* **17**: 303-312.

### SECTION III : Discussion, conclusions et perspectives

## DISCUSSION.

Les antigènes de surface F165<sub>1</sub> et CS31A sont produits par les souches *E. coli* associées à des diarrhées et des septicémies chez le porcelet, le veau et chez les humains (Bertin *et al.*, 1998; Contrepois *et al.*, 1989; Fairbrother *et al.*, 1986). Les adhésines F165<sub>1</sub> et CS31A sont requises lors de l'étape primordiale du processus infectieux, mais leur synthèse n'est pas nécessaire en permanence. En effet, l'interaction hôte-pathogène est un processus dynamique dans lequel le pathogène rencontre diverses conditions environnementales auxquelles il s'adapte pour survivre. F165<sub>1</sub> et CS31A sont codés par les opérons *foo* et *clp* respectivement (Maiti *et al.*, 1994; Martin, 1996). Ces deux opérons font partie de la famille de régulation de l'opéron *pap* (Harel *et al.*, 2000; Herdnay *et al.*, 2002; Martin, 1996). La transcription de *foo*, *clp* et *pap*, est contrôlée par deux mécanismes : la variation de phase et le niveau de transcription. Contrairement à l'opéron *pap*, l'expression des opérons *foo* et *clp* est réprimée en présence de L-leucine ou de L-alanine (Harel *et al.*, 2000; Herdnay *et al.*, 2002; Martin, 1996). Ces deux mécanismes sont modulés en partie en réponse à certaines conditions environnementales telles que la présence de L-leucine ou de L-alanine dans le milieu de culture (Daigle *et al.*, 2000; Martin, 1996). Le mécanisme moléculaire par lequel ces deux acides aminés influencent l'expression de *foo* et *clp* est inconnu. Or, il a été démontré que la leucine et l'alanine interagissent directement avec Lrp et ainsi modifient l'action de Lrp envers certains promoteurs cibles en intensifiant ou en antagonisant l'effet de cette protéine régulatrice (Chen et Calvo, 2002; Zhi *et al.*, 1999). De plus l'action de Lrp sur l'expression de *foo* et *clp* est opposée (Daigle *et al.*, 2000; Martin, 1996). Comprendre comment des facteurs présents dans l'environnement immédiat du pathogène peuvent réguler la synthèse de ces deux facteurs de virulence est important dans l'optique du développement de nouvelles drogues anti-infectieuses en alternative à l'utilisation d'antibiotiques.

Notre étude consiste en la comparaison de la régulation de l'expression des opérons *foo* et *clp*. Pour répondre au premier objectif, l'effet de conditions environnementales sur la transcription basale et la variation de phase, en combinaison et séparément, a été étudié à l'aide de souches portant des fusions transcriptionnelles contenant le gène rapporteur *lacZ*. Les conditions environnementales testées, sont le pH, l'osmolarité, la température, certains



acides aminés, la source de carbone et un milieu de croissance nutritif riche. Le deuxième objectif était d'analyser les mécanismes moléculaires de l'effet de l'alanine et de la leucine sur la variation de phase et la transcription basale des opérons *foo* et *clp*. Tout d'abord, le rôle des protéines régulatrices Lrp, ClpB, FooI dans le contrôle de la transcription basale et/ou de la variation de phase a été caractérisé. Puis, l'effet de l'alanine et de la leucine en présence ou absence de ces régulateurs a été analysé *in vivo*. Dans le troisième objectif, nous avons étudié l'effet de l'alanine ou de la leucine sur l'interaction de Lrp avec ses cibles nucléotidiques en réalisant des tests de retard sur gel et l'étude de la méthylation des sites GATC *in vivo*. Les séquences des régions de régulation des opérons fimbriaires auxquelles se lie Lrp, ont été déterminées. Puis, l'influence de la présence de l'alanine et de la leucine sur l'affinité de Lrp pour les séquences cibles a été examinée, afin de déterminer si une interaction directe entre l'acide aminé et Lrp modifie l'action de Lrp, notamment en changeant son affinité pour une cible ADN donnée.

### **1.1. Effet des conditions environnementales sur la régulation transcriptionnelle des opérons *clp* et *foo*.**

L'expression de nombreux opérons fimbriaires est régulée en réponse aux stimuli environnementaux (Krabbe *et al.*, 2000), et il est accepté que la variété des réponses observées reflète les niches écologiques colonisées par les bactéries produisant ces fimbriae. CS31A et F165<sub>1</sub> sont produits par des *E. coli* responsables de septicémie et de diarrhée (Jallat *et al.*, 1994; Ngeleka *et al.*, 1993). C'est pourquoi nous avons testé, sur l'expression des opérons *clp* et *foo*, l'effet des valeurs ou des unités de pH, d'osmolarité, de la température, ainsi que la richesse nutritive du milieu de culture qui peuvent être rencontrées dans le contenu intestinal, le sang et aussi l'urine (Diem et Lentner, 1972; Evans *et al.*, 1988; Ferraris *et al.*, 1990).

#### **1.1.1. Effet du pH et de l'osmolarité.**

L'expression des opérons *foo* et *clp* est inaltérée ou très peu affectée par un pH de 6 à 8 unités ou par l'osmolarité (215 à 600 msoM) du milieu de croissance bactérien.

### 1.1.2. Effet du glucose.

Les opérons *foo*, *clp*, et *pap* sont tous les trois soumis à la répression catabolique par le glucose (Tableau 3, article I, section II, p 84) (Weyand *et al.*, 2001) totalement ou partiellement pour l'opéron *clp* relevée en présence d'AMPc. De plus, l'effet du glucose sur la variation de phase des opérons *clp* et *foo* amène à une augmentation du nombre de bactéries en phase OFF mais en diminuant la transition de la phase OFF à la phase ON dans le cas de l'opéron *clp*, alors que pour l'opéron *foo*, c'est la transition de la phase ON à la phase OFF qui est augmentée. Donc le mécanisme moléculaire semble différent entre *pap*, *foo* et *clp*.

Si la séquence similaire au consensus de CRP est présente dans la région régulatrice de *foo*, elle n'est pas présente dans celle de *clp* (Fig. 9B, section I, p 31). CRP active directement la transcription de *papBA* et indirectement celle de *papI* par l'intermédiaire de PapB (Weyand *et al.*, 2001). CRP n'est pas nécessaire au mécanisme de la variation de phase de *pap* mais cette protéine régulatrice peut modifier indirectement les taux de transition de l'opéron *pap* (Weyand *et al.*, 2001).

La protéine régulatrice CRP n'est pas la seule à être impliquée dans les mécanismes de répression catabolique par le glucose, en effet la protéine Cra, « Catabolite repressor/activator protein », est impliquée dans les mécanismes de répression catabolique par le glucose indépendant de l'AMPc (Saier et Ramseier, 1996). Il est possible que ce soit cette protéine qui soit impliquée dans la régulation de *clp*.

### 1.1.3. Effet de la température.

A basse température (20°C), la transcription de *foo* est réprimée et il y a augmentation du nombre de bactéries en phase OFF alors que *clp* et *pap* sont bloqués en phase OFF (Göransson *et al.*, 1990; White-Ziegler *et al.*, 1998). Cette différence peut être expliquée par la force du promoteur de *foo* comparée à celle des deux autres opérons. D'une part la variation de phase de *foo* déclenche la production en majorité de cellules en phase-ON alors que pour *pap* et *clp* c'est en majorité des cellules en phase OFF (Blyn *et*

*al.*, 1989; Martin, 1996), d'autre part le taux de transcription de base de *foo* est significativement plus élevé que celui de *clp* (Crosth et *al.*, soumis). Donc, même si l'effet de la température sur l'expression de *foo*, *pap* et *clp* est équivalent, il est moins marqué sur la transcription de *foo* du fait de la variation de phase et du contrôle du taux d'expression.

La thermorégulation de *pap* est effectuée par deux régulateurs indépendamment l'un de l'autre : H-NS et RimJ (White-Ziegler *et al.*, 2002). Bien que les opérons *fim*, *fan* et *daa* subissent un contrôle transcriptionnel en réponse à la température et aux conditions nutritives du milieu de croissance, leur transcription n'est pas affectée par RimJ. Cela semble indiquer que RimJ est un régulateur spécifique de la transcription de l'opéron *pap* (White-Ziegler *et al.*, 2002). Le rôle de RimJ dans la thermorégulation de *foo* et *clp* n'a pas été étudié. Il est possible que RimJ n'exerce aucun effet sur *foo* et donc l'expression de *foo* est moins réprimée que celle de *pap*. H-NS joue un rôle important dans la thermorégulation de l'opéron *pap* en réprimant la transcription de deux gènes codant pour des régulateurs positifs (PapI et PapB) (Göransson *et al.*, 1990). H-NS fixe spécifiquement la région régulatrice de *pap* au niveau des deux sites GATC, et cette fixation bloque la méthylation de ces deux sites à 23°C et non à 37°C. D'après White-Ziegler *et al.*, la température affecterait directement l'état d'oligomérisation de H-NS et donc sa capacité à réprimer la transcription de *pap* à 23°C (White-Ziegler *et al.*, 1998). Les séquences nucléotidiques des régions régulatrices de *pap* et *foo* sont très similaires. Toutefois, il est possible que du fait des petites différences entre les séquences intercistroniques de *foo* et *pap*, H-NS à 20°C ne compacte pas de la même façon ces deux séquences. Pour tester le rôle de H-NS ou de RimJ dans la thermorégulation de *foo* et *clp*, il faudrait introduire les fusions transcriptionnelles *fooB-lacZ* et *clpB-lacZ* dans le génome de la souche isogénique de MC4100 soit H-NS- soit RimJ-.

#### **1.1.4. Effet de l'alanine et de la leucine.**

Des travaux antérieurs ont démontré que deux acides aminés aliphatiques (L-alanine et L-leucine) répriment la transcription des opérons *foo* et *clp* (Daigle *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2000; Martin, 1996). Lors de ce projet, l'action de ces deux acides aminés sur l'expression de *foo* et *clp* a été caractérisée et le mécanisme moléculaire permettant leur

effet inhibiteur a été en partie résolu. En effet, deux modes de répression par ces acides aminés s'exercent sur *clp* et *foo*, celui de l'alanine étant plus drastique que celui de la leucine. L'alanine réprime fortement l'expression de *clp* et *foo* et bloque en phase OFF le promoteur de *clp*. La leucine ne modifie pas la variation de phase des deux opérons mais réprime leur transcription (Tableau 3, article I, section II, p 84). Il semble alors que les mécanismes d'action de l'alanine et de la leucine diffèrent entre les deux acides aminés sur un même opéron. Il apparaît aussi que les mécanismes d'action d'un acide aminé diffèrent entre les deux opérons. En effet, le mécanisme d'action de l'alanine et de la leucine sur l'expression de *foo* semble être seulement dépendant de Lrp, puisque la répression ne s'exerce plus lorsqu'une protéine Lrp mutée, qui ne répond plus à la leucine, remplace la protéine sauvage (Berthiaume *et al.* soumis). Or l'effet répresseur de la leucine et de l'alanine sur *clp* s'exerce aussi bien en absence de Lrp qu'en l'absence de ClpB, mais ne s'exerce plus en absence de Lrp et ClpB (Crost *et al.*, 2003). Ceci suggère que l'alanine et la leucine répriment aussi l'expression de *clp* par un second mécanisme dépendant de ClpB. Ces mécanismes sont présentés et discutés à la suite de l'analyse de la régulation transcriptionnelle de chaque opéron.

D'autres acides aminés, tels que la méthionine, la thréonine, l'aspartate et l'histidine sont capables de réprimer l'expression de *clp* mais pas de *foo* (Fig 3, article I, section II, p83), leur mécanisme d'action n'est pas connu, mais en l'absence de Lrp cette répression s'exerce toujours.

Dans un milieu riche en nutriments, l'expression des deux opérons est réprimée et leur variation de phase est bloquée. L'expression d'autres opérons fimbriaires est aussi diminuée en milieu de croissance riche en nutriments comme *fas*, *fim*, *pap*, *fan*, *daa* (Edwards *et al.*, 1996; Gally *et al.*, 1993; White-Ziegler *et al.*, 2000). White Ziegler *et al.* supposent que le contenu en carbohydrate du milieu LB puisse être responsable de cette répression (White Ziegler *et al.*, 2000). De plus, la quantité de résidus aminés dans ce milieu peut aussi expliquer en partie la répression de l'expression de *foo* et *clp*. Comme Lrp est nécessaire à la variation de phase de *clp* et *foo*, et que la production de Lrp est 4 fois plus forte en M9 (milieu nutritif pauvre) qu'en LB (Landgraf *et al.*, 1996), ceci suggère que l'abolition de la variation de phase de *clp* et *foo* soit expliquée par la quantité limitante en protéine Lrp. En effet, il est possible que Lrp ait une affinité plus faible pour les sites activateurs des régions régulatrices de *clp* et *foo* que pour les sites répresseurs par conséquent, la transition de phase serait bloquée.

L'ensemble de ces conditions environnementales peut être utilisé par *E. coli* pour programmer la synthèse des facteurs d'adhésion. Ainsi, la température corporelle, l'osmolarité, le pH et la disponibilité de nutriments pourraient servir de signaux spécifiques d'entrée dans l'hôte au niveau du lumen intestinal ou du sang. Contrairement à la partie distale de l'intestin, le jéjunum aussi bien que le sang sont des compartiments riches en hydrates de carbone. Peu ou pas d'expression de *foo* et *clp* ne devrait être possible dans ces compartiments, du fait de la présence d'alanine, de leucine et de glucose. Dans nos expériences, la concentration minimale d'alanine ou de leucine testée sur l'expression de *foo* et *clp* était de 5 mM, or c'est vingt-cinq fois plus élevé que la concentration sanguine (Diem et Lentner, 1972). La production de F165<sub>1</sub> et CS31A semble alors possible. Pour vérifier cette hypothèse il faudra tester la production des ces facteurs d'adhésion en culture sur du sang. Il est aussi possible qu'il faille peu de F165<sub>1</sub> et de CS31A pour réaliser leur action de protection de la bactérie contre la lyse par les cellules phagocytaires.

## 1.2. Régulation transcriptionnelle de l'opéron *clp*.

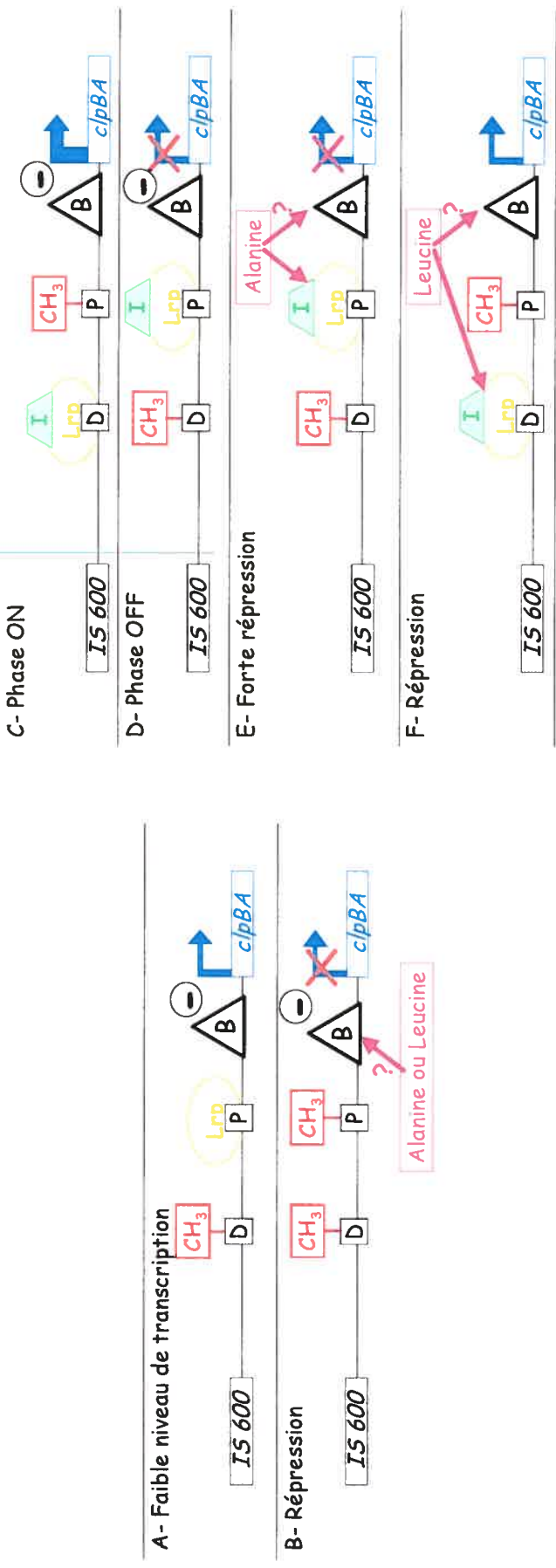
Dans le but de comprendre le mécanisme de régulation transcriptionnelle de l'opéron *clp*, nous avons étudié l'activité de son promoteur dans des souches isogéniques Lrp<sup>+</sup> ou Lrp<sup>-</sup>, transformées ou non avec un plasmide contenant le gène *afaF* sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG et portant soit la fusion transcriptionnelle *clpB-lacZYA* (gène *clpB* entier) soit la fusion *clpB'-lacZYA* (gène *clpB* tronqué). Suite à l'étude des profils de méthylation des sites GATC et de la mesure de l'affinité de Lrp pour des séquences contenant ces sites, nous avons élucidé le mécanisme de variation de phase de l'opéron *clp* (Fig. 1). En absence de AfaF, donc de variation de phase, Lrp et ClpB agissent négativement sur la transcription de l'opéron *clp* (Fig. 1). En absence de Lrp, donc en absence de variation de phase ClpB réprime toujours l'expression de *clp* et AfaF n'a pas d'effet en l'absence de Lrp. En présence d'AfaF et de Lrp, la variation de phase s'instaure. Deux profils de méthylation des sites GATC corrént avec la phase ON et la phase OFF (Fig. 1) et suite à notre étude de l'affinité de Lrp pour les fragments nucléotidiques contenant un des deux sites GATC soit C<sub>dist</sub> et C<sub>prox</sub>, nous pouvons conclure que Lrp fixe

préférentiellement  $C_{prox}$  (GATC proximal) et nécessite la présence de AfaF pour augmenter son affinité pour  $C_{dist}$  (GATC distal).

Donc, le mécanisme de variation de phase de l'opéron *clp* est similaire à celui de l'opéron *pap* (Herdnay *et al.*, 2002). En effet, comme pour *pap*, lorsque le site  $GATC_{prox}$  est méthylé et que le site  $GATC_{dist}$  est fixé par Lrp le promoteur de *clp* est en phase ON, et lorsque la situation inverse est obtenue le promoteur de *clp* est en phase OFF (Herdnay *et al.*, 2002; Nou *et al.*, 1993). De plus, les fréquences de transitions de ON à OFF et de OFF à ON et la proportion de cellules en phase ON dans une colonie sont très similaires à celles de *pap-17* (on observe 10 fois plus de cellules passant de OFF à ON pour *clp* comparé à *pap-17*) (Tableau 1).

Opéron	Taux de transition		% de Lac+
	ON à OFF	OFF à ON	
<i>clp</i> (+AfaF)	31,6/1000	1,47/1000	21,1 3,68
<i>pap17</i>	26/1000	0,157/1000	34 0,36
<i>pap21</i>	3,72/1000	0,305/1000	90 0,74
<i>foo</i>	2,1/1000	35,8/1000	94,5 88,5

**Tableau 1** : Taux de transition de phase des opérons *clp*, *pap17*, *pap21* et *foo*, ainsi que le pourcentage de bactéries en phase ON. Les valeurs pour *pap17* et *pap21* sont tirées de Blyn *et al.*, 1989.



**Fig. 1 :** Modèle de la régulation transcriptionnelle de l'opéron *clp* et de l'effet de l'alanine et de la leucine.

Les sites GATC distal (D) et proximal (P) sont représentés par des carrés. ClpB est représenté par le triangle B, l'homologue de PapI par le trapèze vert I. Lrp est représenté par un ovale jaune. Encadrant la région intercistronique se trouvent une IS600 et l'opéron *clp* en bleu. (A) Faible niveau de transcription de base en absence du régulateur I et d'alanine et de leucine. GATC<sub>dist</sub> est méthylé alors que GATC<sub>prox</sub> est lié par Lrp, ClpB lie une région proche du promoteur de *clp* et exerce son effet répresseur symbolisé par le signe -. (B) L'alanine et la leucine répriment la transcription de base indépendamment de Lrp par un mécanisme inconnu dépendant de ClpB. L'alanine diminue la fixation de Lrp au niveau du site GATC<sub>prox</sub>. (C-D) Le régulateur I lié à Lrp permet à Lrp de fixer le site GATC<sub>dist</sub> dans les cellules en phase ON (C) et augmente la fixation de Lrp à GATC<sub>prox</sub> dans les cellules en phase OFF (D). (E) L'alanine empêche le complexe Lrp-I de se fixer à GATC<sub>dist</sub> et augmente sa fixation à GATC<sub>prox</sub> bloquant alors les cellules en phase OFF. (F) La leucine diminue un peu la fixation du complexe Lrp-I sans modifier la variation de phase de *clp* et réprime la transcription de *clp* par un mécanisme inconnu impliquant ClpB.

Toutefois, en phase ON, il semble que l'activité du promoteur de *pap-17* est plus forte que celle du promoteur de *clp* (Crosth et al., 2003; van der Woude et al., 1995). Lrp a plus d'affinité pour les sites 1-2-3 (région proximale) de *pap* que pour les sites 4-5-6 (région distale) et PapI augmente l'affinité de Lrp pour les sites 4-5-6 (Nou et al., 1995). De façon similaire, Lrp a plus d'affinité pour la région C<sub>prox</sub> de *clp* que pour la région C<sub>dist</sub> et AfaF augmente l'affinité de Lrp pour la région C<sub>dist</sub> (Crosth et al., 2003). D'après les mesures de constante de dissociation (Kd) de Lrp pour des fragments d'ADN de la région régulatrice de *pap*, Lrp montre 2 fois plus d'affinité pour les sites 1-2-3 (région proximale) que les sites 4-5-6 (région distale) (Herdnay et al., 2002; Herdnay et al., 2003) alors qu'il semble que pour *clp* la différence d'affinité de Lrp entre C<sub>dist</sub> et C<sub>prox</sub> soit moins grande. Donc AfaF doit pouvoir augmenter plus facilement l'affinité de Lrp pour la région C<sub>dist</sub> de *clp* que PapI pour les sites 4-5-6 de *pap*, ce qui expliquerait le plus grand nombre de cellules passant de la phase OFF à ON dans le cas de *clp*. Les séquences peptidiques de PapI et AfaF diffèrent, mais on ne sait pas si leur structure tridimensionnelle est différente. Comme l'interaction de PapI ou AfaF est requise pour augmenter l'affinité de Lrp pour les fragments ADN décrits précédemment, est-ce que les différences entre PapI et AfaF peuvent conséquemment avoir aussi un impact sur l'affinité de Lrp pour la région distale comprenant le site GATC distal ou est-ce que ce sont les séquences nucléotidiques qui sont responsables de cette différence d'affinité ? Pour résoudre ces questions, il faudra réaliser par retard sur gel, la comparaison des mesures d'affinité de Lrp pour les deux régions proximales et distales de *pap* et *clp*, puis répéter les mesures en présence d'AfaF ou PapI.

On remarque que ClpB a une action différente de son homologue PapB : ClpB réprime l'expression de *clp* (Crosth et al., 2003) alors que PapB (à concentration physiologique) n'inhibe pas l'expression de *pap-17* (van der Woude et al., 1995). Donc, l'action négative de ClpB sur le promoteur de *clp* permet d'expliquer la différence d'activité entre les promoteurs de *pap-17* et *clp*. Il serait intéressant de déterminer les sites de fixation nucléotidiques de ClpB au niveau de la région régulatrice de *clp* par empreinte génomique, pour mieux comprendre son mécanisme d'action.

En l'absence de Lrp, d'AfaF et de ClpB, l'expression de *clp* n'est toujours pas équivalente à celle de *pap-17* en M9-glycérol. Il est possible que d'autres régulateurs soient responsables de cette différence. Ainsi, alors que CAP active la transcription de *pap* (Weyand et al., 2001), la régulation de l'expression de *clp* semble indépendante de CAP. Un autre régulateur de l'opéron *pap* tel que H-NS ou RimJ, pourrait aussi être responsable



de la différence de régulation transcriptionnelle entre *pap-17* et *clp* (White-Ziegler *et al.*, 2000; White-Ziegler *et al.*, 2002). L'action de H-NS ou de RimJ n'a pas été étudiée sur l'expression de *clp*.

D'après une étude de Nowicki *et al.* la production *in vitro* d'un fimbriae inhibe la synthèse d'un autre facteur d'adhésion pour qu'il n'y ait dans la majorité des cellules qu'une seule adhésine exposée en surface (Nowicki *et al.*, 1984). En effet, la souche *E. coli* KS71, responsable de pyélonéphrite, produit seulement dans 9 % des cellules plus d'un fimbriae (type 1, P, F1C) à sa surface. De plus, Pourbakhsh *et al.* ont montré que des *E. coli* septicémiques aviaires produisent *in vivo* le fimbriae type 1 pour coloniser les organes aériens (sacs aériens, trachée, poumons) et peu de fimbriae P, alors qu'elles produisent le fimbriae P pour la colonisation des organes internes (sang, rate, foie, reins) et très peu le fimbriae type 1 dans ces organes (1997). Une récente étude, *in vitro*, a démontré qu'il existe une régulation croisée par PapB entre les opérons fimbriaires *fim* et *pap* de façon à ce qu'un seul des deux opérons soit en phase ON, donc actif (*pap*) (Xia *et al.*, 2000). Il a été démontré par dot blot avec des anticorps spécifiques contre CS31A ou Pap31A que ces deux facteurs d'adhésion sont produits *in vitro* par la souche 31A en milieu M9 à 37°C (Bertin *et al.*, 2000). Il est donc possible qu'une autre régulation croisée, agoniste cette fois, avec le régulateur PapI, existe: PapI31A régulerait à la fois le passage en phase ON des opérons *pap31A* et *clp*. Pour tester cette hypothèse il faudrait muter le gène *papI<sub>31A</sub>* dans la souche sauvage 31A et observer la variation de phase en immunofluorescence avec des anticorps anti-CS31A.

Comme l'alanine et la leucine inhibent la synthèse de CS31A (Martin, 1996), nous avons analysé le mécanisme d'action de ces acides aminés sur la transcription de *clp*. L'alanine, d'une part, empêche le passage en phase ON en diminuant l'affinité de Lrp pour les sites entourant GATC<sub>dist</sub> (permettant la phase ON) et d'autre part, réprime la transcription de *clp* à l'aide d'un mécanisme inconnu faisant intervenir ClpB (Fig1. ). *In vivo*, la leucine n'est pas capable de diminuer, autant que l'alanine, l'affinité de Lrp pour ses sites nucléotidiques et ne change pas les taux de transition de *clp*. D'après les travaux de Chen *et al.*, lorsque la leucine lie un complexe de plusieurs protéines Lrp (seize Lrp) celui-ci se dissocie en deux octamères couplés à la leucine (Chen *et al.*, 2002). Il est possible que les octamères couplés à la leucine lient toujours de la même façon la région régulatrice de *clp* mais que la structure spatiale de la séquence ADN liée par les octamères

soit perturbée de manière à empêcher en partie l'interaction de l'ARN polymérase avec le promoteur de l'opéron *clp*. Aucune étude n'a encore prouvé que l'alanine interagit avec Lrp. Or dans ce projet nous avons démontré que l'alanine exerce une plus forte répression sur l'expression de *clp* et une plus forte altération de la fixation de Lrp à ces cibles nucléotidiques que la leucine, *in vivo* (Crosthwaite *et al.*, 2003). On peut supposer que l'alanine fixe soit avec une meilleure affinité Lrp et/ou que son interaction avec Lrp modifie de façon plus importante la conformation spatiale de Lrp. La constante d'affinité de l'alanine pour Lrp pourrait être déterminée soit par détermination de l'équilibre de dialyse (Marasco *et al.*, 1994) soit en mesurant l'effet de différentes concentrations d'alanine sur la fluorescence intrinsèque des tyrosines de Lrp tel que décrit par Chen *et al.* pour la leucine (Chen *et al.*, 2002). Lrp contient cinq tyrosines, la fluorescence intrinsèque des tyrosines est excitée à 278 nm et la fluorescence est émise à 304 nm. A l'aide d'un spectrofluoromètre, l'intensité de la fluorescence émise est mesurée. L'addition de leucine à l'échantillon liquide contenant Lrp provoque une diminution de la fluorescence des tyrosines de Lrp, probablement due au changement de conformation de Lrp et/ou à la leucine elle-même qui masque les tyrosines. Il serait aussi intéressant d'analyser par cristallographie la modification de la structure tridimensionnelle de Lrp en présence de leucine ou d'alanine, ainsi que l'effet de ces acides aminés sur la structure des multimères de Lrp et sur leur interaction avec une cible ADN.

De plus, la leucine, comme l'alanine, réprime aussi la transcription de *clp* à l'aide d'un second mécanisme inconnu faisant intervenir ClpB. Dans le but de déterminer si l'alanine et la leucine sont capables de modifier la fixation de ClpB à sa séquence nucléotidique cible dans la région promotrice de *clp*, nous avons essayé de purifier ClpB. La construction de la souche BL21DE3pLysS ClpB a permis de surproduire une protéine ClpB fusionnée en amino-terminal au peptide fixant la calmoduline (CBP, « calmoduline binding peptide ») mais pas de purifier cette protéine de fusion (Annexe 2). Il est probable qu'un repliement de ClpB sur CBP empêche son interaction avec la résine contenant la calmoduline et donc la purification de ClpB. Aucun test de retard sur gel avec cette protéine chimère en extrait brut n'a été réalisé.

### 1.3. Régulation transcriptionnelle de l'opéron *foo*.

Dans le but de comprendre le mécanisme de régulation transcriptionnelle de l'opéron *foo*, nous avons étudié l'activité de son promoteur à l'aide de fusions transcriptionnelles *fooB-lacZYA*. Deux fusions *fooB-lacZYA* ont été construites : une contenant le gène *fooI* entier et une contenant le gène *fooI* tronqué. Ces fusions ont été insérées dans des souches isogéniques Lrp<sup>+</sup> ou Lrp<sup>-</sup>. L'étude des profils de méthylation des deux sites GATC et la mesure de l'affinité de Lrp pour des séquences contenant ces sites, n'ont pas permis d'élucider le mécanisme de variation de phase de l'opéron *foo*. La variation de phase de *foo* est majoritairement en faveur de la phase ON, contrairement à celle des opérons *pap-17* et *clp* (Tableau 1, section III, p147). Tout comme dans le cas de *pap* et *clp*, il semble qu'à la fois Lrp et Fool, un homologue de PapI, soient requis pour ce mécanisme. Les quatre profils de l'état de méthylation des deux sites GATC ont été observés et aucune corrélation n'a pu être faite avec la phase ON et la phase OFF (Tableau 3, article III, section II, p 135). L'étude de la méthylation des sites GATC ne permet pas d'analyser la fixation de Lrp à d'autres sites ne contenant pas une séquence GATC. Or, la région régulatrice de *foo* est très similaire à celle de *pap* (Daigle *et al.*, 2000) et les six sites de fixation de Lrp à la région promotrice de *pap* sont retrouvés dans la séquence de la région promotrice de *foo* (Fig 8B, section I, p28). Il est donc possible que ces autres sites de fixation de Lrp, si ce sont les mêmes que ceux identifiés dans la région régulatrice de *pap* (Nou *et al.*, 1995), puissent démontrer une différence de fixation associable avec l'une des phases d'expression de *foo*. Dans le cas de l'opéron *pap*, *in vitro* l'affinité de Lrp pour les sites 1, 2 et 3 est supérieure à l'affinité de Lrp pour les sites 4, 5 et 6 (Nou *et al.*, 1993). En phase OFF, les sites 1, 2, 3 sont occupés par Lrp et le site 5 est méthylé (Braaten *et al.*, 1994; Nou *et al.*, 1995). PapI permet d'augmenter l'affinité de Lrp pour les sites 4, 5, 6 (van der Woude *et al.*, 1995). En phase ON, les sites 4, 5, 6, sont occupés par le complexe Lrp-PapI et le site 2 est méthylé (Braaten *et al.*, 1994; Nou *et al.*, 1995). Des études de mutation des six sites de la région régulatrice de *pap* ont aussi démontré qu'une mutation ponctuelle est capable de modifier l'affinité de Lrp pour la région contenant cette séquence de telle manière que le mécanisme de variation de phase est altéré et parfois même bloqué (Fig. 2) (Nou *et al.*, 1995). Parmi, les six sites potentiels de fixation de Lrp à la région régulatrice de *foo*, les sites 1 et 4 diffèrent de ceux de *pap* d'une paire de base (Fig. 2). Donc il est possible que l'affinité de Lrp au niveau de ces sites soit changée, et permette de favoriser la phase ON dans le cas du

contrôle transcriptionnel de l'opéron *foo*. Il faudrait réaliser une analyse *in vivo* de la fixation de ces sites par Lrp. Toutefois, le fort pourcentage de bactéries en phase ON dans une colonie en phase OFF risque, même avec une autre technique *in vivo*, de dissimuler le motif de fixation de Lrp de la phase OFF. Donc, pour identifier un motif de fixation de Lrp corrélé à une des deux phases dans la région régulatrice de *foo*, on pourrait tester la mutation de chaque site fixé par Lrp, de façon à ce qu'il ne soit plus lié par la protéine, puis analyser si le promoteur de *foo* est bloqué en phase ON ou OFF. Chaque mutation serait analysée séparément puis en combinaison. La fixation de Lrp au niveau de chaque site serait contrôlée par la technique de protection contre la Dnase, qui permet de donner une image simultanée de l'état de chaque site de fixation et ceci pourrait être testé *in vitro* en présence de concentrations croissantes de Lrp.

région distale		région proximale	
SÉQUENCE ADN		SÉQUENCE ADN	PHÉNOTYPE
<b>SITE 4</b>		<b>SITE 1</b>	
<i>foo</i>	GAAAGGAAAGTCC	<i>foo</i>	GTGTTTTATTtagtt
<i>pap-17</i>	GAAAAGAAAGTCC	<i>pap-17</i>	GTGTTTGTtagtt
#56	TTGCTAGCTACTA	#11	Gctagc
	OFF		fort OFF à ON
<b>SITE 5</b>		<b>SITE 2</b>	
<i>foo</i>	GATCTTTTATGC	<i>foo</i>	GGTTAAAAGATCg
<i>pap-17</i>	GATCTTTTATGC	<i>pap-17</i>	GGTTAAAAGATCg
#14	GCTAGC	#12	GCTAGc
#7	T		fort OFF à ON
	OFF		
	OFF		
<b>SITE 6</b>		<b>SITE 3</b>	
<i>foo</i>	GATGTTTTTa	<i>foo</i>	CATAAAAACTaa
<i>pap-17</i>	GATGTTTTTa	<i>pap-17</i>	CATAAAAACTaa
#57	AGCTAGCAAt	#13	GCTagc
	transition	#16	A
		#17	T
			ON
			ON
			ON

**Tableau. 2 :** Comparaison des six sites de liaison de Lrp à la région régulatrice de *pap-17* et des sites potentiels de fixation de Lrp à la région régulatrice de *foo*.

En lettres majuscules sont indiquées les séquences des sites de fixation de Lrp et en lettres minuscules les séquences nucléotidiques encadrant les sites de fixation de Lrp. Les deux sites GATC sont soulignés. Les nucléotides qui diffèrent entre les sites de *pap* et de *foo* sont indiqués en caractères gras. Les mutations et substitutions des séquences de *pap* avec leur numérotation (#) et le phénotype transcriptionnel, qu'elles induisent, sont indiqués en italique, d'après Nou *et al.* (1995) : *OFF*, phase bloquée en OFF; *transition*, taux de transition normaux; *ON*, phase bloquée en ON.

A la suite de notre étude de l'affinité de Lrp pour les fragments nucléotidiques contenant un des deux sites GATC soit  $F_{\text{dist}}$  et  $F_{\text{prox}}$ , nous avons démontré que Lrp fixe avec autant d'affinité  $F_{\text{prox}}$  que  $F_{\text{dist}}$  et ne nécessite donc pas la présence de FooI pour lier  $F_{\text{dist}}$  (GATC distal ou les autres sites de ce fragment). Donc le mécanisme de variation de phase de l'opéron *foo* semble différent de celui des opérons *pap* et *clp* (Herdnay *et al.*, 2002). Herdnay *et al.* ont démontré qu'en l'absence de la méthylation des sites GATC, il existe le phénomène d'exclusion de fixation de Lrp entre la région contenant les sites 1, 2, 3 et la région contenant les sites 4, 5, 6. Lorsque la mesure de la constante de dissociation de Lrp pour les deux régions est étudiée sur deux fragments d'ADN séparés, le  $K_d$  pour la région contenant les sites 4, 5, 6 est de 1 nM alors que le  $K_d$  pour les sites 1, 2, 3 est de 0,5 nM. Lorsque la même mesure est réalisée avec cette fois les deux fragments reliés, on observe une augmentation de dix fois du  $K_d$  pour les sites 4, 5, 6 alors que le  $K_d$  pour les sites 1, 2, 3 est inchangé. La fixation de Lrp aux sites 1, 2, 3 entraîne l'exclusion de la liaison de Lrp aux sites 4, 5, 6 (Herdnay *et al.*, 2002). Nous n'avons pas mesuré l'affinité de Lrp pour les régions  $F_{\text{dist}}$  et  $F_{\text{prox}}$  alors que ces deux fragments étaient reliés. Toutefois, l'observation de bandes de différents poids moléculaires lors des tests de retard sur gel avec le grand fragment suggère la formation de plusieurs complexes d'affinité différente. Donc il est possible qu'*in vitro* le phénomène d'exclusion de fixation de Lrp s'effectue pour les sites de fixation de Lrp de la région régulatrice de *foo*. *In vivo*, l'étude de l'état de méthylation des sites GATC semble indiquer qu'en absence de FooI, Lrp fixe préférentiellement le site GATCprox par rapport au site GATCdist, et qu'en présence de FooI, l'affinité de Lrp soit augmentée pour GATCdist. Donc il semble qu'il existe une différence d'affinité de Lrp entre les deux régions. Toutefois cette différence d'affinité peut être seulement due à la compétition entre Dam et Lrp pour les sites GATC et non pas au phénomène d'exclusion de fixation. Nous avons réalisé nos études de retard sur gel avec un ADN non méthylé. Comme la méthylation d'un des sites GATC empêche la fixation de Lrp à ce site et que cela semble aussi modifier la fixation de Lrp au niveau des autres sites, est-ce que l'alanine ou la leucine diminuent toujours et autant l'affinité de Lrp pour les sites de la zone nucléotidique GATCdist (ou GATCprox) alors que l'autre site GATC est méthylé ? Il est possible de méthyler *in vitro* les sites GATC d'une séquence ADN et suite à des restriction-ligations il est possible d'obtenir un fragment avec un site GATC méthylé et l'autre non-méthylé (van der Woude *et al.*, 1998). Ces méthodes pourront alors être

utilisées pour étudier l'effet de la méthylation sur l'affinité de Lrp pour ces cibles nucléotidiques en présence ou absence d'alanine ou de leucine.

Bien que les fréquences de transitions de ON à OFF et de OFF à ON et la proportion de cellules en phase ON dans une colonie sont très différentes entre les opérons *pap-17* et *foo*, l'opéron *pap-21* présente le même taux de transition de la phase ON à la phase OFF que l'opéron *foo* et dix fois moins de cellules passant de la phase OFF à la phase ON, et une majorité de bactéries en phase ON (Blyn *et al.*, 1989). Or, les protéines FooI et PapI-21 sont identiques et diffèrent d'un seul résidu aminé de PapI-17 (asparagine/aspartate en position 17). Par conséquent, il est possible que la différence de séquence primaire des homologues de PapI permette une interaction différente de ces régulateurs avec Lrp et que cela modifie les taux de transition de phase des opérons. Toutefois, comme jusqu'à présent aucune complémentation fonctionnelle entre des homologues de PapI n'a échoué (Huisman *et al.*, 1994; Nicholson et Low, 2000) et que les séquences inter-cistroniques de *foo*, *pap-21* et *pap-17* présentent des différences subtiles au niveau des sites potentiels de fixation de Lrp (site 4 diffère d'un nucléotide pour *foo* / *pap17* et *pap21*, et le site 1 diffère d'un nucléotide pour *pap17* / *pap21* et *foo*) ainsi que tout au long de la région régulatrice de ces opérons (Fig. 9B, section I, p 31), il devient important de définir le ou les sites nucléotidiques de fixation des protéines PapI et Lrp pour voir si ce n'est pas plutôt une modification de séquence qui est responsable de la différence des taux de transition de phase de ces trois opérons. C'est pourquoi lors de ce projet la souche BL21DE3pLysS FooI a été construite. Cette souche permet de produire et de purifier FooI (Annexe 2). De plus, des anticorps anti-FooI ont aussi été obtenus (Annexe 3). Jusqu'à présent nos tentatives de retard sur gel avec Lrp et FooI n'ont pas fonctionné.

Le rôle de FooB n'a pas été étudié dans ce projet suite à l'échec de la construction d'une fusion transcriptionnelle *fooB'-lacZYA* (contenant le gène *fooB* tronqué et le gène *fooI* sous le contrôle de son propre promoteur). Lorsque nous avons réalisé la surproduction de FooI et sa purification à partir de la souche BL21DE3pLysS FooI (Annexe 2) nous avons remarqué que, quatre heures suivant l'induction, il n'y avait plus de croissance et que la lyse bactérienne avait déjà commencé (données non présentées). Or il est possible qu'en l'absence de FooB, le gène *fooI* soit fortement transcrit, de façon à ce que la concentration de FooI devienne toxique pour la cellule. Donc il faudrait construire un mutant *fooB* avec le gène *fooI* sous le contrôle d'un promoteur faible pour pouvoir alors comparer l'expression

de *fooBA* en présence ou absence de FooB. Par ailleurs, la construction de la souche BL21DE3pLysS FooB, a permis de produire et de purifier en grande quantité FooB (Annexe 2). Cette protéine pourra être utilisée lors de tests d'interaction avec la région promotrice de *foo* et lors de tests de l'effet direct de l'alanine et de la leucine sur cette interaction.

Comme l'alanine et la leucine inhibent la synthèse de F165 (Fairbrother, 1986), nous avons analysé le mécanisme d'action des ces acides aminés sur la transcription de *foo*. L'alanine et la leucine répriment la transcription de *foo*, mais seul l'alanine modifie la variation de phase de *foo* en bloquant en phase OFF le promoteur de *foo*. Le mécanisme d'action de l'alanine et de la leucine sur l'expression de *foo* semble être seulement dépendant de Lrp, puisque la répression ne s'exerce plus lorsqu'une protéine Lrp mutée, qui ne répond plus à la leucine, remplace la protéine sauvage (Berthiaume *et al.* soumis). Il serait intéressant de déterminer les sites de fixation nucléotidiques de FooB au niveau des régions régulatrices de *foo* par empreinte génomique. Ainsi, on pourrait tester l'effet des deux acides aminés sur la liaison de ce régulateur pour ces cibles nucléotidiques pour vérifier si aucun effet direct de ces acides aminés ne s'exerce sur FooB. D'après les tests de retard sur gel, l'affinité de Lrp pour les fragments  $F_{\text{dist}}$  et  $F_{\text{prox}}$  est diminuée en présence de 5 mM de leucine ou d'alanine. Ceci est très différent de *clp* puisque la fixation de Lrp au fragment  $C_{\text{prox}}$  est presque insensible à l'alanine (Fig. 5, article III, p 134). L'étude de la méthylation des sites GATC montre que la leucine et l'alanine affectent de façon inverse cette méthylation. En effet, en présence d'alanine, on observe une augmentation de la non-méthylation des deux sites GATC alors qu'en présence de leucine c'est la méthylation des deux sites GATC qui augmente (Tableau 3, article III, p 135). Ces deux effets sont indépendants de FooI. Le fait que la leucine augmente l'affinité de Lrp pour les deux sites GATC semble contradictoire avec les résultats de retard sur gel. Toutefois, comme précédemment mentionné, ces résultats renforcent l'hypothèse que la fixation de Lrp aux autres sites soit importante dans la régulation de l'expression de *foo*. De plus, l'effet de l'alanine n'est pas assez drastique sur la méthylation des sites GATC pour expliquer le phénotype de blocage en phase OFF des bactéries en présence d'alanine. Donc, il est probable que les autres sites soient impliqués dans ce mécanisme. La présence de leucine ou d'alanine diminue l'affinité de Lrp pour la région régulatrice de *foo*. Une étude sur l'opéron *dadAX* a démontré que tous les sites de fixation de Lrp ne sont pas tous sensibles aux acides aminés (Zhi *et al.*, 1999). Donc, il serait intéressant d'identifier les séquences de

fixation de Lrp et de FooI au niveau des régions régulatrices de *foo* par empreinte génomique puis d'analyser la capacité des acides aminés à diminuer la fixation de Lrp, de Lrp-FooI. D'après Hernday *et al.*, des expériences non publiées soulignent l'importance de la topologie de l'ADN dans l'expression de l'opéron *pap*. Des travaux menés par Tessier *et al.* sur les promoteurs divergents de *foo* et de *fooI*, confirment cette notion (Tessier *et al.* en préparation). Lrp a aussi pour rôle d'organiser la structure du chromosome bactérien (Calvo et Matthews, 1994; Newman et Lin, 1995). La modification par la leucine ou l'alanine des hexadécamères de Lrp en octamères (Chen et Calvo, 2002) pourrait modifier la compaction de la séquence interagissant soit avec des hexadécamères soit avec des octamères et donc perturber l'accessibilité à l'ARN polymérase.



## CONCLUSIONS.

En conclusion, cette étude a permis de caractériser le mécanisme de la variation de phase régissant l'opéron *clp*. Ce mécanisme est très proche de celui de l'opéron *pap*, mais il diffère par la sensibilité à la leucine et l'alanine. Nous avons démontré que deux modes de répression par ces acides aminés s'exercent sur *clp* : d'une part par une diminution de l'affinité de Lrp en présence d'alanine pour les sites nucléotidiques permettant la phase ON, et par probablement l'encombrement stérique des octamères de Lrp liés à la leucine empêchant l'interaction entre l'ARN polymérase et le promoteur de *clp* ; d'autre part, par un autre mécanisme impliquant ClpB, ce mécanisme n'agit pas sur la variation de phase mais sur la transcription de base de *clp*. Nous avons démontré que l'alanine et la leucine répriment de façon similaire la transcription de *foo* mais que certaines différences par rapport à *clp* existent : il ne semble pas exister de mécanisme de répression de *foo* indépendant de Lrp, de plus, l'opéron *foo* est plus sensible que *clp* puisque à 1.5 mM on constate une nette répression de l'expression de *foo* en présence d'alanine et de leucine alors que pour *clp* c'est à 5 mM que l'on observe cette répression. De plus, le mécanisme de variation de phase contrôlant l'activité du promoteur de *foo* est beaucoup plus favorable à la production de cellules en phase-ON que celui de *clp* et *pap*. Il semble aussi que la protéine FooI ou que les différences de séquences des sites de fixation de Lrp puissent être responsables de la plus grande rapidité de transition de phase par rapport aux opérons *clp* et *pap*. FooI n'est pas requise pour l'action négative des deux acides aminés. Ce travail a aussi démontré que d'autres conditions environnementales régulent la transcription des opérons *foo* et *clp* : la température, la richesse du milieu nutritionnel, la pression osmotique et le pH doivent être identiques aux conditions rencontrées dans l'hôte dans le compartiment sanguin ou dans l'intestin pour permettre l'expression optimale de ces opérons. Ainsi Le mécanisme de répression des opérons *foo* et *clp* par l'alanine et la leucine semble être une voie prometteuse en vue du développement d'une stratégie thérapeutique avec l'utilisation directe de ces composés comme traitement préventif de septicémie et diarrhée chez le veau et le porcelet.

## BIBLIOGRAPHIE.

- Abraham, J.M., Freitag, C.S., Clements, J.R., et Eisenstein, B.I. (1985) An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**: 5724-5727.
- Andrews, J.H. (1995) What if bacteria are modular organism. *ASM News* **61**: 627-632.
- Azam, T.A., et Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 33105-33113.
- Båga, M., Göransson, M., Normark, S., et Uhlin, B.E. (1985) Transcriptional activation of a *pap* pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO journal* **4**: 3887-3893.
- Båga, M., Norgren, M., et Normark, S. (1987) Biogenesis of *E. coli* Pap pili: PapH, a minor pilin subunit involved in cell anchoring and length modulation. *Cell* **49**: 241-251.
- Båga, M., Göransson, M., Normark, S., et Uhlin, B.E. (1988) Processed mRNA with differential stability in the regulation of *E. coli* pilin gene expression. *Cell* **52**: 197-206.
- Barber, A.M., Zhurkin, V.B., et Adhya, S. (1993) CRP-binding sites: evidence for two structural classes with 6-bp and 8-bp spacers. *Gene* **130**: 1-8.
- Béka, L. (1998) Étude d'adhésion et d'invasion d'*Escherichia coli* sur culture cellulaire. In *Sciences vétérinaires* Montréal: Université de Montréal.
- Beloin, C., Exley, R., Mahé, A.L., Zouine, M., Cubasch, S., et Le Hégarat, F. (2000) Characterization of LrpC DNA-binding properties and regulation of *Bacillus subtilis* *lrpC* gene expression. *Journal of Bacteriology* **182**: 4414-4424.
- Berg, O.G., et von Hippel, P.H. (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *Journal of Molecular Biology* **200**: 709-723.
- Berrington, A.W., Tan, Y.-C., Srikhanta, Y., Huipers, B., van der Ley, P., Peak, I.R.A., et Jennings, M.P. (2002) Phase variation in meningococcal lipooligosaccharide biosynthesis genes. *FEMS Microbiology Letters* **34**: 267-275.
- Bertin, P., Hommais, F., Krin, E., Soutourina, O., Tendeng, C., Derzelle, S., et Danchin, A. (2001) H-NS and H-NS-like proteins in Gram-negative bacteria and their multiple role in the regulation of bacterial metabolism. *Biochimie* **83**: 235-241.

- Bertin, Y., Girardeau, J.-P., Der Vartanian, M., et Martin, C. (1993) The ClpE protein involved in biogenesis of the CS31A capsule-like antigen is a member of periplasmic chaperone family in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **108**: 59-68.
- Bertin, Y., Martin, C., Girardeau, J., Pohl, P., et Contrepois, M. (1998) Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiology Letters* **162**: 235-239.
- Bertin, Y., Girardeau, J., Darfeuille-Michaud, A., et Martin, C. (2000) Epidemiological study of *pap* genes among diarrheagenic or septicemic *Escherichia coli* strains producing CS31A and F17 adhesins and characterization of Pap<sub>31A</sub> fimbriae. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 1502-1509.
- Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.Y., Murray, W., Tobe, T., Fernandez, R., et Schoolnik, G.K. (1998) Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**: 2114-2118.
- Bilge, S.S., Apostol, J.M.J., Aldape, M.A., et Moseley, S.L. (1993) mRNA processing independent of RNase III and RNase E in the expression of the F1845 fimbrial adhesin of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 1455-1459.
- Blomfield, I.C. (2001) The regulation of Pap and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Advances in Microbial Physiology* **45**: 1-45.
- Blyn, L.B., Braaten, B.A., White-Ziegler, C.A., Rolfson, D.H., et Low, D.A. (1989) Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional regulation. *EMBO Journal* **8**: 613-620.
- Blyn, L.B., Braaten, B.A., et Low, D.A. (1990) Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential *dam* methylation states. *EMBO Journal* **9**: 4045-4054.
- Bousquet, F. (1994) L'antigène CS31A d'*E. coli* septicémiques et entérotoxigéniques: carte génétique et utilisation pour la présentation d'épitopes hétérologues. Clermont-Ferrand: Blaise Pascal.
- Boye, E., et Løbner-Olesen, A. (1990) The role of *dam* methyltransferase in the control of DNA replication in *E. coli*. *Cell* **62**: 981-989.

- Braaten, B.A., Blyn, L.B., Skinner, B.S., et Low, D.A. (1991) Evidence for a methylation-blocking factor (*mbf*) locus involved in *pap* pilus expression and phase variation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **173**: 1789-1800.
- Braaten, B.A., Platko, J.V., van der Woude, M.W., Simons, B.H., de Graaf, F.K., Calvo, J.M., et Low, D.A. (1992) Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the *pap* and *fan* pili operons in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**: 4250-4254.
- Braaten, B.A., Nou, X., Kaltenbach, L.S., et Low, D.A. (1994) Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**: 577-588.
- Brinkman, A.B., Dahlke, I., Tuininga, J.E., Lammers, T., Dumay, V., de Heus, E., Lebbink, J.H.G., Thomm, M., de Vos, W.M., et van der Oost, J. (2000) An Lrp-like transcriptional regulator from the archeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 38160-38169.
- Busby, S., et Kolb, A. (1996) The CAP modulon. In *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. Lin, E.C.C. et Lynch, A.S. (eds): R.G. Landes company, pp. 255-279.
- Calvo, J., et Matthews, R.G. (1994) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* **58**: 466-490.
- Carey, J. (1991) Gel retardation. In *Methods in Enzymology*. Vol. 208: Academic press, inc., pp. 103-117.
- Casadaban (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage Lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology* **104**: 541-555.
- Chandler, M., et Fayet, O. (1993) Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Molecular Microbiology* **7**: 497-503.
- Chapman, R.M., Robinson, L.S., Pinkner, J., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., et Hultgren, S. (2002) Role of *Escherichia coli* Curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**: 851-855.
- Chen, S., Rosner, M.H., et Calvo, J.M. (2001) Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (LRP) from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **312**: 625-635.

- Chen, S., et Calvo, J. (2002) Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. *Journal of Molecular Biology* **318**: 1031-1042.
- Cherifi, A., Contrepois, M., Picard, B., Goullet, P., de Rycke, J., Fairbrother, J.M., et Barnouin, J. (1990) Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiology Letters* **70**: 279-284.
- Contrepois, M., Dubourguier, H.C., Parodi, A.L., Girardeau, J.P., et Ollier, J. (1986) Septicemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. *Veterinary Microbiology* **12**: 109-118.
- Contrepois, M., Fairbrother, J.M., Kaura, Y.K., et Girardeau, J. (1989) Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada and India. *FEMS Microbiology Letters* **59**: 319-324.
- Contrepois, M., Bertin, Y., Girardeau, J., Picard, B., et Goullet, P. (1993) Clonal relationships among bovine pathogenic *Escherichia coli* producing surface antigen CS31A. *FEMS Microbiology Letters* **106**: 217-222.
- Crost, C., Garrivier, A., Harel, J., et Martin, C. (2003) Leucine-responsive regulatory protein-mediated repression of *clp* (encoding CS31A) expression by L-leucine and L-alanine in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **185**: 1886-1894.
- Cui, Y., Wang, Q., Stormo, G.D., et Calvo, J. (1995) A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *Journal of Bacteriology* **177**: 4872-4880.
- Daigle, F., Dozois, C.M., Jacques, M., et Harel, J. (1997) Mutations in the *f165(1)A* and *f165(1)E* fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Microbial Pathogenesis* **22**: 247-252.
- Daigle, F., Forget, C., Martin, C., Drolet, M., Tessier, M.C., Dezfulian, H., et Harel, J. (2000) Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Research in Microbiology* **151**: 1-12.
- Danese, P.N., et Silhavy, T.J. (1997) The  $\sigma^E$  and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes & Development* **11**: 1183-1193.
- De Graaf, F.K., Klaasen, P., et van Hees, J.E. (1980) Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. *Infection and Immunity* **30**: 125-128.
- de Wind, N., de Jong, M., et Stuitje, A.R. (1985) Site-directed mutagenesis of the *Escherichia coli* chromosome near *oriC*: identification and characterization of *asnC*,

- a regulatory element in *E. coli* asparagine metabolism. *Nucleic Acids Research* **13**: 8797-8811.
- Der Vartanian, M., Jaffeux, B., Contrepois, M., Chavarot, M., Girardeau, J.-P., Bertin, Y., et Martin, C. (1992) Role of aerobactin in systemic spread of an opportunistic strain of *Escherichia coli* from the intestinal tract of gnotobiotic lambs. *Infection and Immunity* **60**: 2800-2807.
- Di Martino, P., Bertin, Y., Girardeau, J., Livrelli, V., Joly, B., et Darfeuille-Michaud, A. (1995) Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and Immunity* **63**: 4336-4344.
- Di Martino, P., Girardeau, J., Der Vartanian, M., Joly, B., et Darfeuille-Michaud, A. (1997) The central variable V2 region of the CS31A major subunit is involved in the receptor-binding domain. *Infection and Immunity* **65**: 609-616.
- Diem, K., et Lentner, C. (1972) *Tables scientifiques*. Bâle, Suisse.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottscha, G., et Hacker, J. (2002) Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity* **70**: 6365-6372.
- Dodson, K.W., Jacob-Dubuisson, F., Striker, R.T., et Hultgren, S.J. (1993) Outer-membrane PapC molecular usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 3670-3674.
- Dodson, K.W., Pinkner, J.S., Rose, T., Magnusson, G., Hultgren, S., et Waksman, G. (2001) Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell* **105**: 733-743.
- Dong, A., Malecki, J.M., Lee, L., Carpenter, J.F., et Lee, J.C. (2002) Ligand-induced conformational and structural dynamics changes in *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *Biochemistry* **41**: 6660-6667.
- Donnenberg, M.S., et Whittam, T.S. (2001) Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation* **107**: 539-548.
- Dubreuil, J.D., et Fairbrother, J.M. (1992) Biochemical and serological characterization of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165(2). *FEMS Microbiology Letters* **95**: 219-224.

- Dybvig, K. (1993) DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Molecular Microbiology* **10**: 465-471.
- Edwards, R.A., Cao, J., et Schifferli, D.M. (1996) Identification of major and minor chaperone proteins involved in the export of 987P fimbriae. *Journal of Bacteriology* **178**: 3426-3433.
- Ernsting, B., Atkinson, M.R., Ninfa, A.J., et Matthews, R.G. (1992) Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **174**: 1109-1118.
- Ernsting, B.R., Denninger, J.W., Blumenthal, R.M., et Matthews, R.G. (1993) Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: How is a leuxine-incensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? *Journal of Bacteriology* **175**: 7160-7169.
- Evans, D.F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A.G., et Dyson, T.J. (1988) Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* **29**: 1035-1041.
- Fairbrother, J.M., Larivière, S., et Lallier, R. (1986) New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. *Infection and Immunity* **51**: 10-15.
- Fairbrother, J.M., Lallier, R., Leblanc, L., Jacques, M., et Larivière, S. (1988) Production and purification of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165. *FEMS Microbiology Letters* **56**: 247-252.
- Fairbrother, J.M., et Ngeleka, M. (1994) Extraintestinal *Escherichia coli* infections in Pigs. In *Escherichia coli in domestic animals and humans*. Gyles, C.L. (ed). Wallingford: CAB international, pp. 221-235.
- Ferraris, R.P., Yasharpour, S., Llyod, K.C., Mirzayan, R., et Diamond, J.M. (1990) Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *American Journal of Physiology* **259**: G822-837.
- Free, A., et Dorman, C.J. (1997) The *Escherichia coli* *stpA* gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. *Journal of Bacteriology* **179**: 909-918.
- Free, A., Williams, R.M., et Dorman, C.J. (1998) The StpA protein functions as a molecular adapter to mediate repression of the *bgl* operon by truncated H-NS in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **180**: 994-997.

- Freundéus, B., Wachtler, C., Hedlund, M., Fischer, H., Samuelsson, P., Svensson, M., et Svangorg, C. (2001) *Escherichia coli* P fimbriae utilize the toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Molecular Microbiology* **40**: 37-51.
- Friedberg, D., Platko, J.V., Tyler, B., et Calvo, J. (1995) The amino acid sequence of Lrp is highly conserved in four enteric microorganisms. *Journal of Bacteriology* **177**: 1624-1626.
- Friedberg, D., Midkiff, M., et Calvo, J. (2001) Global versus local regulatory roles for Lrp-related proteins: *Haemophilus influenzae* as a case study. *Journal of Bacteriology* **183**: 4004-4011.
- Gally, D.L., Bogan, J.A., Eisenstein, B.I., et Blomfield, I.C. (1993) Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *Journal of Bacteriology* **175**: 6186-6193.
- Garcia, M.I., Gounon, P., Courcoux, P., Labigne, A., et Le Bouguénec, C. (1996) The afimbrial adhesive sheath encoded by the *afa-3* gene cluster of pathogenic *Escherichia coli* is composed of two adhesins. *Molecular Microbiology* **19**: 683-693.
- Girardeau, J., Der Vartanian, M., Ollier, J., et Contrepois, M. (1988) CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity* **56**: 2180-2188.
- Girardeau, J.-P., Bertin, Y., Martin, C., Der Vartanian, M., et Boeuf, C. (1991) Sequence analysis of the *clpG* gene, which codes for the surface antigen CS31A subunit: evidence of an evolutionary relationship between CS31A, K88, and F41 subunit genes. *Journal of Bacteriology* **173**: 7673-7683.
- Göransson, M., et Uhlin, B.E. (1984) Environmental temperature regulates transcription of a virulence pili operon in *E. coli*. *EMBO Journal* **3**: 2885-2888.
- Göransson, M., Forsman, K., et Uhlin, B.E. (1988) Functional and structural homology among regulatroy cistrons of pili-adhesin determinants in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **212**: 412-417.
- Göransson, M., Forsman, K., Nilsson, P., et Uhlin, B.E. (1989a) Upstream activation sequences that are shared by two divergently transcribed operons mediate cAMP-CRP regulation of pilus-adhesin in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **3**: 1557-1565.



- Göransson, M., Forsman, K., et Uhlin, B.E. (1989b) Regulatory genes in the thermoregulation of *Escherichia coli* pili gene transcription. *Genes & Development* **3**: 123-130.
- Göransson, M., Sondén, B., Nilsson, P., Dagberg, B., Forsman, K., Emanuelsson, K., et Uhlin, B.E. (1990) Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature* **344**: 682-684.
- Haagmans, W., et Van Der Woude, M. (2000) Phase variation of Ag43 in *Escherichia coli*: Dam-dependent methylation abrogates OxyR binding and OxyR-mediated repression of transcription. *Molecular Microbiology* **35**: 877-887.
- Hacker, J. (1992) Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Canadian Journal of Microbiology* **38**: 720-727.
- Hacker, J. (1996) Microbial pathogenicity factors as parts of global regulatory networks. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **43**: 19-24.
- Hajishengallis, G., Martin, M., Sojar, H.T., Sharma, A., Schifferle, R.E., DeNardin, E., Russell, M.W., et Genco, R.J. (2002) Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **9**: 403-411.
- Hale, W.B., van der Woude, M.W., et Low, D.A. (1994) Analysis of nonmethylated GATC sites in the *Escherichia coli* chromosome and identification of sites that are differentially methylated in response to environmental stimuli. *Journal of Bacteriology* **176**: 3438-3441.
- Hallet, B. (2001) Playing Dr. Jekyll and Mr Hyde: combined mechanisms of phase variation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 570-581.
- Hammar, M., Zhao, B., et Normark, S. (1996) Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**: 6562-6566.
- Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R.F.A., van Putten, J.P.M., Zollinger, W.D., Gerardy-Schahn, R., et Frosch, M. (1996) Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*) correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Molecular Microbiology* **20**: 1211-1220.

- Harel, J., Daigle, F., Maiti, S., Desautels, C., Labigne, A., et Fairbrother, J.M. (1991) Occurrence of *pap*-, *sfa*-, *afa*-related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiology Letters* **82**: 177-182.
- Harel, J., Forget, C., Ngeleka, M., Jacques, M., et Fairbrother, J.M. (1992a) Isolation and characterization of adhesin-defective *TnphoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K-:F165. *Journal of General Microbiology* **138**: 2337-2345.
- Harel, J., Forget, C., Saint-Amand, J., Daigle, F., Dubreuil, D., Jacques, M., et Fairbrother, J. (1992b) Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165(1), a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicaemic *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **138**: 1495-1502.
- Harel, J., Jacques, M., Fairbrother, J.M., Bosse, M., et Forget, C. (1995) Cloning of determinants encoding F165(2) fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. *Microbiology* **141**: 221-228.
- Harel, J., et Martin, C. (1999) Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Research* **30**: 131-155.
- Harel, J., Daigle, F., Forget, C., Tessier, M.C., Crost, C., et Martin, C. (2000) Phase variation of F165(1) (Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicaemia in animals. *Canadian Journal of Microbiology* **46**: 1101-1107.
- Harvill, E.T., et Miller, J.F. (2000) Manipulating the host to study bacterial virulence. *Current Opinion in Microbiology* **3**: 93-96.
- Hattman, S., van Ormondt, H., et de Waard, A. (1978) Sequence specificity of the wild type *dam*<sup>+</sup> and mutant *dam* forms of bacteriophage T2 DNA adenine methylase. *Journal of Molecular Biology* **119**: 361-376.
- Hay, N.A., Tipper, D.J., Gyci, D., et Hughes, C. (1997) A nonswarming mutant of *Proteus mirabilis* lacks the Lrp global transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology* **179**: 4741-4746.
- Hedlund, M., Frendéus, B., Wachtler, C., Hang, L., Fischer, H., et Svangorg, C. (2001) Type 1 fimbriae deliver an LPS- and TLR4-dependent activation signal to CD14-negative cells. *Molecular Microbiology* **39**: 542-552.
- Henderson, I.R., Owen, P., et Nataro, J.P. (1999) Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation (MicroReview). *Molecular Microbiology* **33**: 919-932.

- Hendrickson, W., Stoner, C., et Schleif, R. (1990) Characterization of the *Escherichia coli* *araFGH* and *araJ* promoters. *Journal of Molecular Biology* **215**: 497-510.
- Henrichsen, J. (1983) Twitching motility. *Annual Review of Microbiology* **37**: 81-93.
- Herdnay, A., Krabbe, M., Braaten, B., et Low, D. (2002) Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**: 16470-16476.
- Herdnay, A., Braaten, B., et Low, D. (2003) The mechanism by which DNA adenine methylase and PapI activate the Pap epigenetic switch. *Molecular Cell* **12**: 947-957.
- Holden, N.J., Uhlin, B.E., et Gally, D.L. (2001) PapB paralogues and their effect on the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **42**: 319-330.
- Holst, B., Sogaard-Andersen, L., Pedersen, H., et Valentin-Hansen, P. (1992) The cAMP-CRP>CytR nucleoprotein complex in *Escherichia coli* two pairs of closely linked binding sites for the cAMP-CRP activator complex are involved in combinatorial regulation of the *cdd* promoter. *EMBO Journal* **11**: 3635-3643.
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J., Danchin, A., et Bertin, P. (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Molecular Microbiology* **40**: 20-36.
- Huisman, T.T., Bakker, D., Klaasen, P., et de Graaf, F.K. (1994) Leucine-responsive regulatory protein, *IS1* insertions, and the negative regulator FaeA control the expression of the *fae* (K88) operon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **11**: 525-536.
- Hultgren, S.J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St. Geme III, J.W.S., et Normark, S. (1993) Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* **73**: 887-901.
- Humphries, H.E., et High, N.J. (2002) The role of *licA* phase variation in the pathogenesis of invasive disease by *Haemophilus influenzae* type b. *FEMS Microbiology Letters* **34**: 221-230.
- Hung, D.L., Raivio, T.L., Jones, C.H., Silhavy, T.J., et Hultgren, S.J. (2001) Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *EMBO Journal* **20**: 1508-1518.

- Hung, S.P., Baldi, P., et Hatfield, G.W. (2002) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of leucine responsive regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 40309-40323.
- Jacob-Dubuisson, F., Heuser, J., Dodson, K., Normark, S., et Hultgren, S. (1993) Initiation of assembly and association of the structural elements of a bacterial pilus depend on two specialized tip proteins. *EMBO Journal* **12**: 837-847.
- Jacob-Dubuisson, F., Pinkner, J., Xu, X., Striker, R., et Padmanabhan, A. (1994) PapD chaperone function in pilus biogenesis depends on oxidant and chaperone-like activities of DsbA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 11552-11556.
- Jallat, C., Darfeuille-Michaud, A., Girardeau, J., Rich, C., et Joly, B. (1994) Self-transmissible R plasmids encoding CS31A among human *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal stools. *Infection and Immunity* **62**: 2865-2873.
- Johanson, I.M., Plos, K., Marklund, B.I., et Svanborg, C. (1993) Pap, *papG* and *prsG* DNA sequences in *Escherichia coli* from fecal flora and urinary tract. *Microbial Pathogenesis* **15**: 121-129.
- Johansson, J., Eriksson, S., Sonden, B., Wai, S.N., et Uhlin, B.E. (2001) Heteromeric interactions among nucleoid-associated bacterial proteins: localization of StpA-stabilizing regions in H-NS of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**: 2343-2347.
- Johnson, J.R. (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews* **4**: 80-128.
- Johnson, J.R., et Brown, J.J. (1996) A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant *papG* genes encoding the Gal( $\alpha$ 1-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* **173**: 920-926.
- Johnson, J.R., Brown, J.J., et Maslow, J.N. (1998) Clonal distribution of the three alleles of the Gal( $\alpha$ 1-4)Gal-specific adhesin gene *papG* among *Escherichia coli* strains from patients with bacteremia. *Journal of Infectious Diseases* **177**: 651-661.
- Johnson, R.C., et Simon, M.I. (1985) Hin-mediated site specific recombination requires two 26 bp recombination sites and a 60 bp recombinational enhancer. *Cell* **41**: 781-791.

- Jones, C.H., Danese, P.N., Pinkner, J.S., Silhavy, T.J., et Hultgren, S.J. (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO Journal* **16**: 6394-6406.
- Kallipolitis, B.H., Norregaard-Madsen, M., et Valentin-Hansen, P. (1997) Protein-protein communication: structural model of the repression complex formed by CytR and the global regulator CRP. *Cell* **89**: 1101-1109.
- Kaltenbach, L.S., Braaten, B.A., et Low, D.A. (1995) Specific binding of PapI to Lrp-pap DNA complexes. *Journal of Bacteriology* **177**: 6449-6455.
- Kaltenbach, L.S., Braaten, B., Tucker, J., Krabbe, M., et Low, D. (1998) Use of a two-color genetic screen to identify a domain of the global regulator Lrp that is specifically required for *pap* phase variation. *Journal of Bacteriology* **180**: 1224-1234.
- Khan, A.S., et Schifferli, D.M. (1994) A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the adhesin. *Infection and Immunity* **62**: 4223-4243.
- Khan, A.S., Kniep, B., Oelschlaeger, T.A., van Die, I., Korhonen, T., et Hacker, J. (2000) Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **68**: 3541-3547.
- Klemm, P., et Christiansen, G. (1987) Three *fim* genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Molecular and General Genetics* **208**: 439-445.
- Kolb, A., Igarashi, K., Ishihama, A., Lavigne, M., Buckle, M., et Buc, H. (1993) *E. coli* RNA polymerase, deleted in C-terminal part of its alpha-subunit, interacts differently with the cAMP-CRP complex at the *lacPI* and at the *galPI* promoter. *Nucleic Acids Research* **21**: 319-326.
- Kolling, R., et Lother, H. (1985) AsnC: an autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **164**: 310-315.
- Korhonen, T.K., Valtonen, M.V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Ørskov, I., Svenson, S.B., et Mäkela, P.H. (1985) Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infection and Immunity* **48**: 486-491.
- Korth, M.J., Lara, J.C., et Moseley, S.L. (1994) Epithelial cell invasion by bovine septicemic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **62**: 41-47.

- Krabbe, M., Weyand, N., et Low, D. (2000) Environmental control of pilus gene expression. In *Bacterial stress responses*. Storz, G. et Hengge-Aronis (eds). Washington, DC, USA: ASM Press, pp. 305-321.
- Kuehn, M.J., Heuser, J., Normark, S., et Hultgren, S.J. (1992) P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* **356**: 252-255.
- Labigne-Roussel, A., Lark, D., Schoolnik, G.K., et Falkow, S. (1984) Cloning and expression of an afimbrial adhesin (Afa-1) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from pyelonephritic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity* **46**: 251-259.
- Landgraf, J.R., Wu, J., et Calvo, J. (1996) Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **178**: 6930-6936.
- Landini, P., et Zehnder, A.J.B. (2002) The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *Journal of Bacteriology* **184**: 1522-1529.
- Le Bouguénec, C., et Bertin, Y. (1999) Afa and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Veterinary Research* **30**: 317-342.
- Leathart, J.B.S., et Gally, D.L. (1998) Regulation of type 1 fimbrial expression in uropathogenic *Escherichia coli*: heterogeneity of expression through sequence changes in the *fim* switch region. *Molecular Microbiology* **28**: 371-381.
- Leonard, P.M., Smits, S.H.J., Sedelnikova, S.E., A.B., B., de Vos, W.M., van der Oost, J., Rice, D.W., et Rafferty, J.B. (2001) Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archeon *Pyrococcus furiosus*. *EMBO Journal* **20**: 990-997.
- Lerrer, B., et Gilboa-Garber, N. (2001) Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin with quail egg white glycoproteins. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 1095-1100.
- Levine, M.M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteroathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases* **155**: 377-389.
- Lim, J.K., Gunther, N.W.T., Zhao, H., Johnson, D.E., Keay, S.K., et Mobley, H.L.T. (1998) *In vivo* phase variation of *Escherichia coli* type 1 fimbrial genes in women with urinary tract infection. *Infection and Immunity* **66**: 3303-3310.

- Lin, R., D'Ari, R., et Newman, E.B. (1990) The leucine regulon of *Escherichia coli* K-12: a mutation in *rblA* alters expression of L-leucine-dependent metabolic operons. *Journal of Bacteriology* **172**: 4529-4535.
- Lin, R., D'Ari, R., et Newman, E.B. (1992a)  $\lambda$  *placMu* insertions in genes of the leucine regulon: extension of the regulon to genes not regulated by leucine. *Journal of Bacteriology* **174**: 1948-1955.
- Lin, R., Ernsting, B., Hirshfield, I.N., Matthews, R.G., Neidhart, F.C., R.L., C., et Newman, E.B. (1992b) The *lrp* gene product regulates expression of *lysU* in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **174**: 2779-2784.
- Lindberg, F., Lund, B., et Normark, S. (1986) Gene products specifying adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* are minor components of pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **83**: 1891-1895.
- Low, D.A., Braaten, B., et Van Der Woude, M. (1996) Fimbriae. In *Escherichia coli and Salmonella*. Vol. 1. Curtiss III R., I.J.L., Lin E. C. C., Low K. B., Magasanik B., Reznikoff W. S., Riley M., Schaechter M., Umbrager H. E. (ed). Washington DC.: American Society for Microbiology, pp. 146-157.
- Low, D.A., Weyand, N.J., et Mahan, M.J. (2001) Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infection and Immunity* **69**: 7197-7204.
- Maiti, S., Harel, J., et Fairbrother, J.M. (1993) Structure and copy number analyses of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related gene clusters in F165-positive bovine and porcine *Escherichia coli* isolates. *Infection and Immunity* **61**: 2453-2461.
- Maiti, S.N., DesGroseillers, L., Fairbrother, J.M., et Harel, J. (1994) Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165(1) of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787. *Microbial Pathogenesis* **16**: 15-25.
- Marasco, R., Varcamonti, M., La Cara, F., Ricca, M., De Felice, M., et Sacco, M. (1994) *In vivo* footprinting analysis of Lrp binding to *ilvIH* promoter region of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **176**: 5197-5201.
- Marklund, B.I., Tennent, J.M., Garcia, E., Hamers, A., Baga, M., Lindberg, F., Gaastra, W., et Normark, S. (1992) Horizontal gene transfert of the *Escherichia coli* *pap* and *prs* pili operons as a mechanism for the development of tissue specific adhesive properties. *Molecular Microbiology* **6**: 2225-2242.

- Martin, C., Boeuf, C., et Bousquet, F. (1991) *Escherichia coli* CS31A fimbriae: molecular cloning, expression and homology with the K88 determinant. *Microbial Pathogenesis* **10**: 429-442.
- Martin, C. (1996) The *clp* (CS31A) operon is negatively controlled by Lrp, ClpB, and L-alanine at the transcriptional level. *Molecular Microbiology* **21**: 281-292.
- Matthews, R.G., Cui, Y., Friedberg, D., et Calvo, J. (2000) Wild-type and hexahistidine-tagged derivatives of leucine-responsive regulatory protein from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* **324**: 322-329.
- Mc Kay, D.B., et Steitz, T.A. (1981) Structure of catabolite gene activator protein at 2.9°A resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* **290**: 744-749.
- Méchin, M.-C. (1994) Etude immunostructurale de ClpG, sous-unité majeure de l'antigène polymérique CS31A produit par des souches de *Escherichia coli* et utilisation pour l'insertion d'épitopes viraux à des fins vaccinales. In *Sciences biologiques fondamentales et appliquées*. Clermont-Ferrand: Blaise Pascal, pp. 122.
- Mekalanos, J.J. (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *Journal of Bacteriology* **174**: 1-7.
- Metcalf, J.W., Krogfelt, K.A., Krivan, H.C., Cohen, P.S., et Laux, D.C. (1991) Characterization and identification of a porcine small intestine mucus receptor for the K88ab fimbrial adhesin. *Infection and Immunity* **59**: 91-96.
- Meyer, T.F., Gibbs, C.P., et Haas, R. (1990) Variation and control of protein expression in *Neisseria*. *Annual Review of Microbiology* **44**: 451-477.
- Miller, J.F. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press,.
- Morschhäuser, J., Uhlin, B.E., et Hacker, J. (1993a) Transcriptional analysis and regulation of the *sfa* determinant coding for S fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains. *Molecular and General Genetics* **238**: 97-105.
- Morschhäuser, J., Vetter, V., Korhonen, T., Uhlin, B.E., et Hacker, J. (1993b) Regulation and binding properties of S fimbriae cloned from *E. coli* strain causing urinary tract infection and meningitis. *Zentralblatt für Bakteriologie* **278**.
- Morschhäuser, J., Vetter, V., Emödy, L., et Hacker, J. (1994) Adhesin regulatory genes within large, unstable DNA regions of pathogenic *Escherichia coli*: cross-talk between different adhesin gene clusters. *Molecular Microbiology* **11**: 555-566.



- Nagy, B., et Fekete, P.Z. (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary Research* **30**: 259-284.
- Nataro, J.P., et Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* **11**: 142-201.
- Newman, E.B., et Lin, R. (1995) Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annual Review of Microbiology* **49**: 747-775.
- Newman, E.B., et Lin, R. (1996) The leucine Lrp regulon. In *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. Lin, E.C.C. et Simon, A. (eds): R.G. Landes company, pp. 419-433.
- Ngeleka, M., Jacques, M., Martineau-Doizé, B., Daigle, F., Harel, J., et Fairbrother, J.M. (1993) Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165<sub>1</sub> fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. *Infection and Immunity* **61**: 836-843.
- Ngeleka, M., Martineau-Doizé, B., et Fairbrother, J.M. (1994) Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K"V165" F165<sub>1</sub> resists killing by porcine polymorphonuclear leukocytes in vitro: role of F165<sub>1</sub> fimbriae and K"V165" O-antigen capsule. *Infection and Immunity* **62**: 398-404.
- Ngeleka, M., et Fairbrother, J.M. (1999) F165(1) fimbriae of the P fimbrial family inhibits the oxidative response of porcine neutrophils. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **25**: 265-274.
- Nicholson, B., et Low, D. (2000) DNA methylation-dependant regulation of Pef expression in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* **35**: 728-742.
- Norgren, M., Normark, S., Lark, D., O'Hanley, P.D., Schoolnik, G.K., Falkow, S., Svanborg-Eden, C., Baga, M., et Uhlin, B.E. (1984) Mutations in *E. coli* cistrons affecting adhesion to human cells do not abolish Pap pili fiber formation. *EMBO Journal* **3**: 1159-1165.
- Norgren, M., Baga, M., Tennent, J.M., et Normark, S. (1987) Nucleotide sequence, regulation and functional analysis of the *papC* gene required for cell surface localization of Pap pili of uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **1**: 169-178.
- Nou, X., Skinner, B., Braaten, B., Blyn, L., Hirsch, D., et Low, D. (1993) Regulation of pyelonephritis-associated pili phase-variation in *Escherichia coli*: binding of the

- PapI and the Lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation. *Molecular Microbiology* **7**: 545-553.
- Nou, X., Braaten, B., Kaltenbach, L., et Low, D.A. (1995) Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. *EMBO journal* **14**: 5785-5797.
- Nowicki, B., Rhen, M., Vaisanen-Rhen, V., Pere, A., et Korhonen, T. (1984) Immunofluorescence study of fimbrial phase variation in *Escherichia coli* KS71. *Journal of Bacteriology* **160**: 691-695.
- Okeke, I.N., et Nataro, J.P. (2001) Enteraggative *Escherichia coli*. *Lancet Infectious Diseases* **1**: 304-313.
- Olsen, A., Wick, M.J., Mörgelin, M., et Björck, L. (1998) Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infection and Immunity* **66**: 944-949.
- Ørskov, I., et Ørskov, F. (1990) Serologic classification of fimbriae. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **151**: 71-90.
- Otto, G., Sandberg, T., Marklund, B.I., Ulleryd, P., et Svanborg, C. (1993) Virulence factors and *pap* genotype in *Escherichia coli* isolates from women with acute pyelonephritis, with or without bacteremia. *Clinical Infectious Diseases* **17**: 448-456.
- Ottow, J.C.G. (1975) Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili.
- Passner, J.M., et Steitz, T.A. (1997) The structure of a CAP-DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 2843-2847.
- Passner, J.M., Schultz, S.C., et Steitz, T.A. (2000) Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1°A resolution. *Journal of Molecular Biology* **304**: 847-859.
- Pernstig, A.K., Normark, S., Georgellis, D., et Melefors, O. (2000) The role of the AirS two-component system in uropathogenic *Escherichia coli*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **485**: 137-142.
- Platko, J.V., et Calvo, J.M. (1993) Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. *Journal of Bacteriology* **175**: 1110-1117.

- Podigliano, Pogliano, J., Lynch, A.S., Belin, D., Lin, E.C., et Beckwith, J. (1997) Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes and Development* **11**: 1169-1182.
- Polaczek, P., Kwan, K., et Campbell, J.L. (1998) GATC motifs may alter the conformation of DNA depending on sequence context and N6-adenine methylation status: possible implications for DNA-protein recognition. *Molecular and General Genetics* **258**: 488-493.
- Pourbakhsh, S.A., Dho-Moulin, M.Y., Brée, A., Desautels, C., Martineau-Doizé, B., et Fairbrother, J.M. (1997) Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* **22**: 331-341.
- Powell, B., Rivas, M.P., Court, D.L., Nakamura, Y., et Turnbough, J. (1994) Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Research* **22**: 5765-5766.
- Rakotoarivonina, H., Jubelin, G., Hebraud, M., Gaillard-Martinie, B., Forano, E., et Mosoni, P. (2002) Adhesion to cellulose of the gram-positive bacterium *Ruminococcus albus* involves type IV pili. *Microbiology* **148**: 1871-1880.
- Ramseier, T.M., Bledig, S., Michotey, V., Feghali, R., et Saier, M.H.J. (1995) The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **16**: 1157-1169.
- Ramseier, T.M., et Saier, M.H.J. (1995) c-AMP c-AMP receptor protein complex; five binding sites in the control region of the *Escherichia coli* manitol operon. *Microbiology* **141**: 1901-1907.
- Rex, J.H., Aronson, B.D., et Somerville, R.L. (1991) The *tdh* and *serA* operons of *Escherichia coli*: mutational analysis of the regulatory elements of leucine-responsive genes. *Journal of Bacteriology* **173**: 5944-5953.
- Ricca, E., Aker, D.A., et Calvo, J. (1989) A protein that binds to the regulatory region of the *Escherichia coli* *ilvIH* operon. *Journal of Bacteriology* **171**: 1658-1664.
- Richet, E., et Raibaud, O. (1991) Supercoiling is essential for the formation and stability of the initiation complex at the divergent *malEp* and *malKp* promoters. *Journal of Molecular Biology* **218**: 529-542.

- Ringquist, S., et Smith, C.L. (1992) The *Escherichia coli* chromosome contains specific, unmethylated *dam* and *dcm* sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**: 4539-4543.
- Roesch, P.L., et Blomfield, I.C. (1998) Leucine alters the interaction of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) with the *fim* switch to stimulate site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **27**: 751-761.
- Saier, J. (1993) Regulatory interactions involving the proteins of the phosphotransferase system in enteric bacteria. *Journal of Cellular Biochemistry* **51**: 62-68.
- Saier, M.H.J., et Ramseier, T.M. (1996) The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *Journal of Bacteriology* **178**: 3411-3417.
- Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E.R., et Achtman, M. (1994) Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Molecular Microbiology* **13**: 207-217.
- Saulino, E.T., Bullitt, E., et Hultgen, S.J. (2000) Snapshots of usher-mediated protein secretion and ordered pilus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**: 9240-9245.
- Saunders, J.R. (1986) The genetic basis of phase and antigenic variation in bacteria. In *Antigenic variation in Infectious Diseases*. Birkbeck, T.H. et Penn, C.W. (eds). Oxford, pp. 57-76.
- Schrembi, M.A., Christiansen, G., et Klemm, P. (2001) FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **41**: 1419-1430.
- Schröder, O., et Wagner, R. (2002) The bacterial regulatory protein H-NS a versatile modulator of nucleic acid structures. *Biological Chemistry* **383**: 945-960.
- Schultz, S.C., Shields, G.C., et Steitz, T.A. (1991) Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90°. *Science* **253**: 1001-1007.
- Sedelnikova, S.E., Smits, S.H.J., Leonard, P.M., Brinkman, A.B., van der Oost, J., Rafferty, J.B., et Rice, D.W. (2001) Crystallization and quaternary structure analysis of an Lrp-like regulatory protein from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *Acta Crystallographica* **D57**: 886-888.
- Seifert, H.S. (1996) Questions about gonococcal pilus phase- and antigenic variation. *Molecular Microbiology* **21**: 433-440.
- Simons, R.W., Houman, F., et Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96.

- Smyth, C.P.L., T., Renzoni, D., Siligardi, G., Beavil, R., Layton, M., Sidebotham, J.M., Hinton, J.C.D., Driscoll, P.C., Higgins, C.F., et Ladbury, J.E. (2000) Oligomerization of the chromatin-structuring protein H-NS. *Molecular Microbiology* **36**: 962-972.
- Snyder, W.B., Davis, L.J.B., Danese, P.N., Cosma, C.L., et Silhavy, T.J. (1995) Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, supresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. *Journal of Bacteriology* **177**: 4216-4223.
- Sonnenfield, J.M., Burns, C.M., Higgins, C.F., et Hinton, J.C.D. (2001) The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a greater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in *hns* mutant. *Biochimie* **83**.
- Soto, G.E., et Hultgren, S.J. (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology* **181**: 1059-1071.
- Stromberg, N., Marklund, B.I., Lund, B., Ilver, D., Hamers, A., Gaastra, W., Karlsson, K., et Normark, S. (1990) Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal(alpha1-4)Gal-containing isoreceptors. *EMBO Journal* **9**: 2001-2010.
- Swanson, J., Bergstrom, S., Robbins, K., Barrera, O., Corwin, D., et Koomey, J.M. (1986) Gene conversion involving the pilin structural gene correlates with pilus+ in equilibrium with pilus- changes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Cell* **47**: 267-276.
- Tani, T.H., Khodursky, A., Blumenthal, R.M., Brown, P.O., et Matthews, R.G. (2002) Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**: 13471-13476.
- Tanskanen, J., Saarela, S., Tankka, S., Kalkkinen, N., Rhen, M., Korhonen, T.K., et Westerlund-Wikström, B. (2001) The *gaf* fimbrial gene cluster of *Escherichia coli* expresses a full-size and truncated soluble adhesin protein. *Journal of Bacteriology* **183**: 512-519.
- Tavazoie, S., et Chirch, G.M. (1998) Quantitative whole-genome analysis of DNA-protein interactions by *in vivo* methylase protection in *E. coli*. *Nature Biotechnology* **16**: 566-571.

- Thanassi, D.G., Saulino, E.T., et Hultgen, S.J. (1998) The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Current Opinion in Microbiology* **1**: 223-231.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alpen, L., et Verbrugh, H. (1998) Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 275-293.
- van der Woude, M., et Low, D. (1994) Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **11**: 605-618.
- van der Woude, M., Braaten, B., et Low, D. (1996) Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology* **4**: 5-9.
- van der Woude, M., Bradley Hale, W., et Low, D.A. (1998) Formation of DNA methylation patterns: nonmethylated GATC sequences in *gut* and *pap* operons. *Journal of Bacteriology* **180**: 5913-5920.
- van der Woude, M.W., Braaten, B.A., et Low, D.A. (1992) Evidence for global regulatory control of pilus expression in *Escherichia coli* by Lrp and DNA methylation: model building based on analysis of *pap*. *Molecular Microbiology* **6**: 2429-2435.
- van der Woude, M.W., Kaltenbach, L.S., et Low, D.A. (1995) Leucine-responsive regulatory protein plays dual roles as both an activator and a repressor of the *Escherichia coli pap* fimbrial operon. *Molecular Microbiology* **17**: 303-312.
- Waldron, D.E., Owen, P., et Dorman, C.J. (2002) Competitive interaction of the OxiR DNA-binding protein and the Dam methylase at the antigen 43 gene regulatory region in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **44**: 509-520.
- Wang, Q., et Calvo, J. (1993) Lrp, a major regulatory protein in *Escherichia coli*, bends DNA and can organize the assembly of a high-order nucleoprotein structure. *EMBO Journal* **12**: 2495-2501.
- Wang, Q., Wu, J., Friedberg, D., Platko, J.V., et Calvo, J. (1994) Regulation of the *Escherichia coli lrp* Gene. *Journal of Bacteriology* **176**: 1831-1839.
- Wasteson, Y. (2001) Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica Suppl.* **95**: 79-84.
- Weber, I.T., et Steitz, T.A. (1987) Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **198**: 311-326.

- Weyand, N.J., et Low, D.A. (2000) Regulation of Pap phase variation. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 3192-3200.
- Weyand, N.J., Braaten, B.A., Van Der Woude, M., Tucker, J., et Low, D.A. (2001) The essential role of the promoter-proximal subunit of CAP in *pap* phase variation: Lrp- and helical phase-dependent activation of *papBA* transcription by CAP from -215. *Molecular Microbiology* **39**: 1504-1522.
- Whitchurch, C.B., Hobbs, M., Livingston, S.P., Krishnapillai, V., et Mattick, J.S. (1990) Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching mobility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. *Gene* **101**: 33-44.
- White-Ziegler, C.A., et Low, D.A. (1992) Thermoregulation of the *pap* operon: evidence for the involvement of RimJ, the N-terminal acetylase of ribosomal protein S5. *Journal of Bacteriology* **174**: 7003-7012.
- White-Ziegler, C.A., Angus Hill, M.L., Braaten, B.A., van der Woude, M.W., et Low, D.A. (1998) Thermoregulation of *Escherichia coli pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Molecular Microbiology* **28**: 1121-1137.
- White-Ziegler, C.A., Villapakkam, A., Ronaszeki, K., et Young, S. (2000) H-NS controls *pap* and *daa* fimbrial transcription in *Escherichia coli* in response to multiple environmental cues. *Journal of Bacteriology* **182**: 6391-6400.
- White-Ziegler, C.A., Black, A.M., Eliades, S.H., Young, S., et Porter, K. (2002) The N-acetyltransferase RimJ responds to environmental stimuli to repress *pap* fimbrial transcription in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **184**: 4334-4342.
- Willins, D.A., Ryan, C.W., Platko, J.V., et Calvo, J. (1991) Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 10768-10774.
- Xia, Y., Forsman, K., Jass, J., et Uhlin, B.E. (1998) Oligomeric interaction of the PapB transcriptional regulator with the upstream activating region of pili adhesin gene promoters in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **30**: 513-523.
- Xia, Y., et Uhlin, B.E. (1999) Mutational analysis of the PapB transcriptional regulator in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 19723-19730.

- Xia, Y., Gally, D.L., forsman, K., et Uhlin, B.E. (2000) Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. *EMBO Journal* **19**: 1450-1457.
- Zhi, J., Mathew, E., et Freundlich, M. (1999) Lrp binds to two regions in the *dadAX* promoter region of *Escherichia coli* to repress and activate transcription directly. *Molecular Microbiology* **32**: 29-40.
- Zhou, G., Mo, W., Sebbel, P., Min, G., Neubert, T.A., Golckshuber, R., Wu, X., Sun, T., et Kong, X. (2001) Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from *in vitro* FimH binding. *Journal of Cell Science* **114**: 4095-40103.
- Zhou, Y., Busby, S., et Ebright, R.H. (1993) Identification of the functional subunit of a dimeric transcription activator protein by use of oriented heterodimers. *Cell* **73**: 375-379.
- Zhou, Y., Pendergrast, P.S., Bell, A., Williams, R., Busby, S., et Ebright, R.H. (1994) The functional subunit of a dimeric transcription activator protein depends on promoter architecture. *EMBO Journal* **13**: 4549-4557.
- Zieg, J., Silverman, M., Hilmen, M., et Simon, M. (1977) Recombinational switch for gene expression. *Science* **196**: 170-172.



## ANNEXES

## ANNEXE 1 : EFFET DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR L'ACTIVITE DU PROMOTEUR DE *fooI*.

Voici les résultats des tests de l'effet de la leucine, de l'alanine, du glucose et du LB sur l'expression du promoteur de *fooI*.

type de souche	Génotype	Milieu de croissance	Phénotype de la colonie de départ	Fréquence de transition		activité b-gal par colonie <sup>a</sup>	% de colonie Lac+
				ON to OFF	OFF to ON		
MC4100.λ03	<i>fooI-lacZ</i> Lrp+ FooI+ FooB+	M9-glycérol	ON	6 x 10 <sup>-3</sup>		146 ± 29	86.0
			OFF		1.7 x 10 <sup>-2</sup>	40 ± 3	42.3
		M9-glycérol + leucine	ON	3.98 x 10 <sup>-2</sup>		63 ± 17	1.7
			OFF		7.91 x 10 <sup>-5</sup>	11 ± 2	0.2
		M9-glycérol + alanine	uniforme	-	-	30 ± 4	-
MC4100.λRS551 <sup>b</sup>	témoins négatif	M9-glucose	uniforme	-	-	42 ± 9	-
		LB	uniforme	-	-	37 ± 7	-
		M9-glycérol	uniforme	-	-	8 ± 1	-
DL844.λRS551 <sup>b</sup>	témoins négatif	M9-glycérol	uniforme	-	-	9 ± 1	-

**Tableau A1** : Phénotype de la variation de phase, fréquences de transition et activité β-galactosidase du promoteur de *fooI*.

<sup>a</sup> exprimé en unités Miller. <sup>b</sup> Souche lysogène lambda portant la séquence d'ADN recombinée du plasmide pRS551.

L'expression de *fooI* est réprimée en présence de leucine, d'alanine, de glucose et LB comme l'opéron *foo*. La variation de phase de *fooI* est bloquée en présence d'alanine, de glucose et de LB, mais pas en présence de leucine. Contrairement à l'opéron *foo*, on observe une diminution significative du nombre de colonie ON en présence de leucine. Cette diminution est due à l'augmentation de la fréquence de transition de la phase ON à phase OFF (7 fois) et à la diminution de la fréquence de transition de la phase OFF à phase ON (215 fois). En M9-leucine, comme il ne reste que très peu de cellules exprimant *fooI* (1,7 %), il est probable que FooI ne soit pas nécessaire à la variation de phase de l'opéron *foo* qui elle est inchangée et permet d'avoir 92 % de cellule en phase ON. En présence de glucose, la variation de phase de *foo* est inchangée alors que celle de *fooI* est bloquée.

## **ANNEXE 2 : CONSTRUCTION ET PURIFICATION DES PROTEINES DE FUSION CBP-FooI, CBP-FooB, CBP-ClpB.**

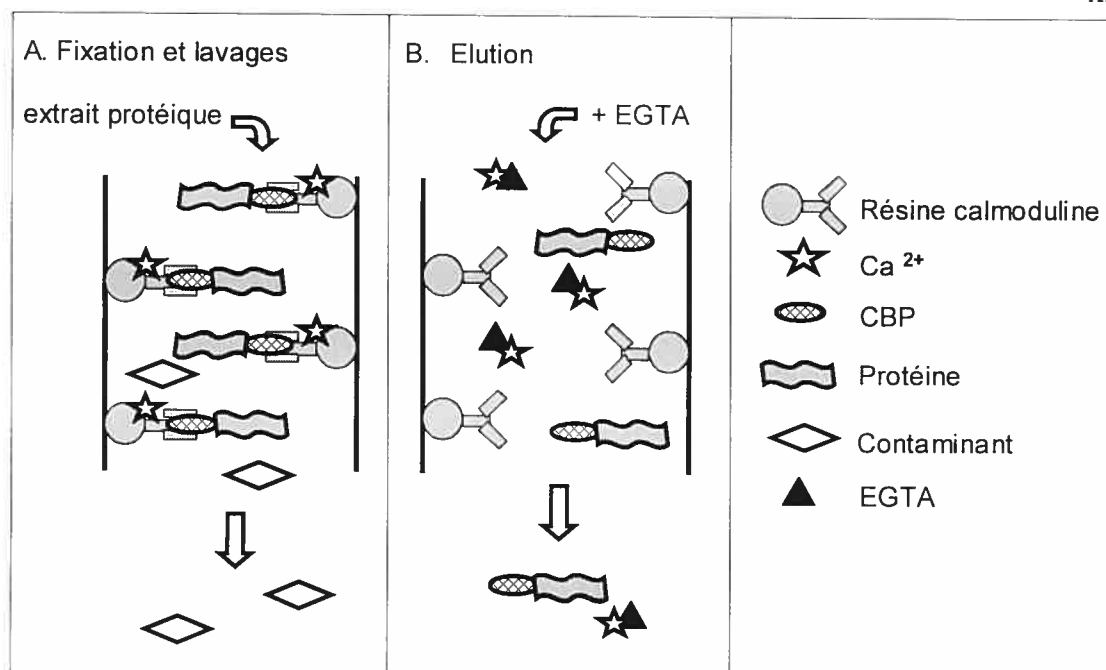
Pour purifier les protéines FooI, FooB, et ClpB nous avons construit des protéines de fusion avec un petit peptide, CBP ou « Calmoduline Binding Peptide », qui présente une forte affinité pour la calmoduline en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . La purification s'effectue à l'aide d'une colonne d'affinité sur laquelle de la calmoduline est fixée. Par la suite, on peut retirer le CBP de la protéine de fusion par clivage spécifique de la liaison peptidique joignant CBP à la protéine (Fig. A). Ainsi, la digestion par l'entérokinase de la protéine de fusion a permis de séparer les protéines FooI et FooB de CBP, mais ceci n'a jamais été testé sur CBP-ClpB car nous n'avons pas réussi à purifier cette protéine de fusion.

Nous avons utilisé un kit commercialisé par Stratagene. Le gène codant pour la protéine choisie a été cloné dans le plasmide pCAL-n-EK, portant un gène codant pour CBP, ce gène étant sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG. A la suite du gène codant pour le CBP, se trouve une petite séquence codant pour le site de reconnaissance de la protéase entérokinase (EK). Le gène codant pour la protéine à synthétiser a été cloné sans son promoteur juste après le site EK, en phase avec le gène codant pour le CBP. Le plasmide ainsi constitué a été introduit dans des *E. coli* BL21(DE3)pLysS compétentes. Le plasmide présent dans ces colonies a été ensuite séquencé pour vérifier qu'aucune mutation n'a altéré les gènes codant pour le CBP et la protéine à synthétiser. La souche d'*E. coli* utilisée est déletée des gènes codant pour les protéases, donc aucune dégradation protéique ne peut se produire dans cette souche. En présence de 2 mM d'IPTG, les bactéries recombinantes ont synthétisé les protéines de fusion en quantité importante. Les niveaux de croissance bactérienne devant être atteints pour induire la production des protéines ainsi que les temps d'incubation après induction requis pour avoir une synthèse maximale sont indiqués dans le tableau A2 suivant :

Protéines fusionnées avec CBP	FooI	FooB	ClpB
OD <sub>600</sub> pour ajouter l'IPTG	entre 0.3 et 0.5	entre 0.3 et 0.8	entre 0.3 et 0.5
Temps d'incubation après l'ajout de l'IPTG	4 h OD <sub>600</sub> de 1	6 h OD <sub>600</sub> de 1.3	6 h OD <sub>600</sub> de 1.3

**Tableau A2 :** Niveau de croissance bactérienne et temps d'incubation requis pour la surproduction des protéines de fusion CBP-FooI, CBP-FooB et CBP-ClpB.

Une fois l'incubation finie, le culot bactérien a été resuspendu dans 30 ml de tampon A (50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM Imidazole, 1 mM Acétate de magnésium, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) auquel a été ajouté 100 µM de PMSF, 1 mg/ml de lysosyme. Puis, les bactéries ont été cassées à la presse de French (700 unités). La dégradation de l'ADN et de l'ARN a été réalisée pendant 15 min en ajoutant 10 µg de RNase et 5 µg de DNase. Après centrifugation (20 min à 15000g), le surnageant a été mélangé avec la résine calmoduline 50 % équilibrée, pendant une nuit. Le mélange surnageant-résine calmoduline a ensuite été placé dans une colonne en polypropylène (Qiagen). Suite au lavage de la résine avec 80 ml de tampon A, l'élution des protéines de fusion a été réalisée avec 20 ml tampon B (50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA) (Fig. B). 200 µl de tampon TG<sub>50</sub>ED ont été rajoutés à chaque tube contenant 1 ml d'élution, ce tampon étant indispensable pour conserver les protéines chimères sous forme native. Le clivage par l'entérokinase pour détacher le CBP de la protéine a été réalisé tel qu'indiqué par le manufacturier (Affinity LIC Cloning and Protein Purification de Stratagene).



**Fig. A1** : Schéma de la purification par chromatographie d'affinité des protéines de fusions CBP-FooI et CBP-FooB.

(A) Le tampon A permet l'interaction entre la résine calmoduline et la protéine de fusion car il contient des ions calcium. Les lavages successifs avec le tampon A permettent d'enlever les protéines contaminantes. (B) Le tampon d'élution contient de l'EGTA qui chélate les ions calcium, détachant ainsi le CBP de la calmoduline.

### **ANNEXE 3 : PRODUCTION ET PURIFICATION DES ANTICORPS IGY ANTI-FOOI ET ANTI-LRP.**

#### **Immunisation des poules**

Pour chaque poule 650 mg de protéine purifiée, clivée, mélangé à un volume égal d'adjuvant de Freund incomplet, a été injecté à une poule pendant un mois et demi à toutes les deux semaines d'intervalle. Les œufs ont été récupérés chaque jours pendant trois mois et conservés à 4°C.

#### **Protocole d'extraction des anticorps d'œufs.**

Avec une seringue, le jaune d'œuf est aspiré sans prendre le vitellus, on obtient environ 10 ml par œuf. Mélanger (vortex) 30 à 60 secondes un volume de jaune d'œuf avec 1 volume de PBS 1 X. Ajouter deux volumes de chloroforme, et mixer jusqu'à l'obtention d'une pâte blanchâtre. Centrifuger 15 min à 10000 trs/min (rotor SS34 de SORVAL). Récupérer le surnageant contenant les anticorps (IgY) et le conserver au congélateur.

## ANNEXE 4 : ABSORPTION ET METABOLISME DE LA LEUCINE ET DE L'ALANINE CHEZ *E. COLI*.

*E. coli* est capable de synthétiser tous les acides aminés dont elle a besoin, lorsqu'elle ne peut en absorber du milieu de croissance.

Les acides aminés entrent dans le périplasma par diffusion passive et vont se lier à certaines protéines de la membrane interne pour être transporté dans le cytoplasme. Trois systèmes de transport de la leucine ont été identifiés : LIV I, LS, LIV II. La transcription des gènes codant pour LIV I et LS sont réprimés par Lrp, la leucine renforce l'action de Lrp, et est sensible au choc osmotique. LIV I permet le transport des trois acides aminés branchés qui sont la leucine, la valine et l'isoleucine, alors que LS transporte spécifiquement la leucine. Les systèmes de transport LIV I et LS nécessitent de l'énergie pour fonctionner, ils sont couplés à l'hydrolyse de l'ATP (Umbarger, 1996; Rahmanian *et al.*, 1973). LIV II transporte les trois acides aminés branchés, et la transcription de ces gènes n'est pas réprimée par la leucine et est insensible au stress osmotique. LIV II semble couplé à l'utilisation des protons (Rahmanian *et al.*, 1973). Le transport de L-alanine à travers la membrane interne, se fait par l'intermédiaire de deux systèmes : LIV I, et un autre système non identifié, mais qui permet aussi l'absorption de D-alanine, de glucine et de D-sérine (Robbins et Oxender, 1973).

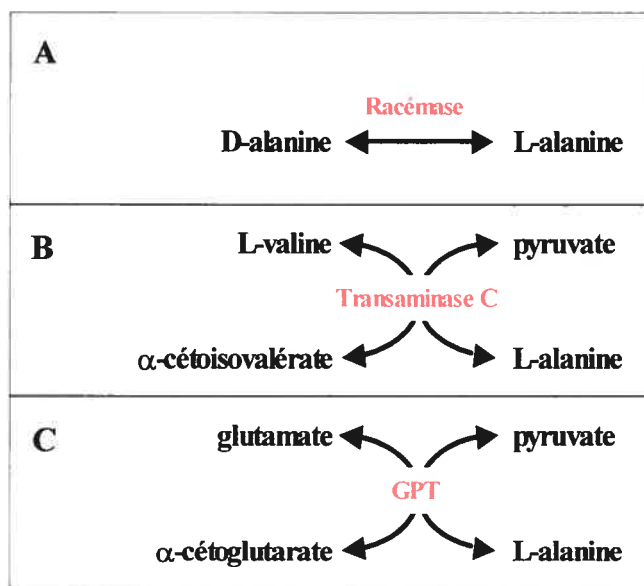
### Biosynthèse de L-alanine

Il existe trois voies de biosynthèse de la L-alanine (Fig. ) (Reitzer, 1996) :

- la racémisation, qui permet la production de la L-alanine à partir de la D-alanine. Deux enzymes codées par *dadX* et *alr* ont cette fonction chez *E. coli*.
- la transamination, c'est le transfert du groupement aminé d'un résidu aminé donneur vers un métabolite accepteur pour obtenir un autre acide aminé. Deux transaminases impliquée dans la production d'alanine ont été mises en évidence. La transaminase C (codée par *avt*) utilise la valine et la GTP « glutamic-pyruvic transaminase » (codée par *alaB*) utilise le

glutamate comme donneur du groupement aminé. L'enzyme GTP est peu requise pour la biosynthèse d'alanine par *E.coli*.

- Une troisième enzyme est impliquée dans la production d'alanine, elle est codée par le gène *alaA*.



**Fig. A2** : Schéma des voies de biosynthèse de L-alanine chez *E. coli*.

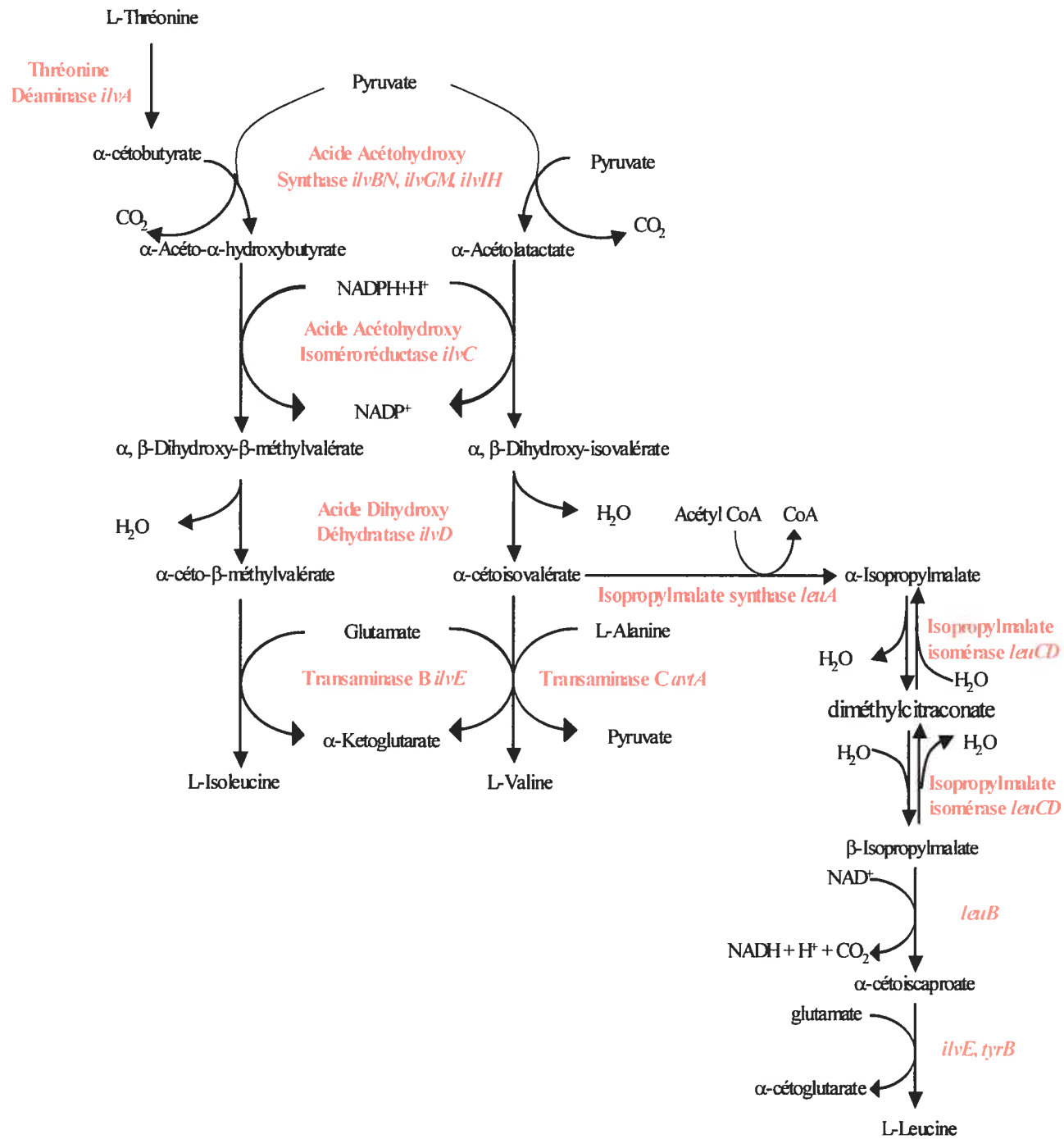
(A) Racémisation. (B) (C) Transamination.

### Biosynthèse de la L-leucine

Il existe une seule voie de biosynthèse de la L-leucine. La production de leucine nécessite l'utilisation du précurseur de la valine, qui est l'α-cétoisovalérate. Les voies de biosynthèse de la valine et de l'isoleucine et de la leucine utilisent des enzymes communes (Fig. 18). Une régulation complexe contrôle la biosynthèse des trois acides aminés branchés en réponse aux conditions environnementales. En effet, la présence d'un des trois acides aminés branchés dans le milieu de culture va entraîner un rétrocontrôle négatif réprimant de la transcription de *ilvBN*, *ilvGM*, et *ilvIH* qui codent pour trois isomères de la première enzyme commune, l'acide acétohydroxy synthase, ainsi que l'expression de *ilvD* codant l'acide dihydroxy déshydratase qui est la troisième enzyme commune à la biosynthèse de



Ile, Val et Leu. De plus les trois acides aminés répriment aussi la transcription de *ilvE* qui code pour la transaminase B, dernière enzyme nécessaire à la biosynthèse de l'isoleucine, de la valine et de la leucine.



**Fig. A3 :** Schéma des voies de biosynthèse de l'isoleucine, de la valine et de la leucine.

Les gènes codant pour les enzymes ainsi que les enzymes sont indiqués en rouge. D'après Umbarger, 1996.

## Liste des coauteurs des articles inclus dans la thèse.

### article 1

Influence of environmental cues on the transcriptional regulation of *foo* and *clp* coding for F1651 and CS31A adhesins in *Escherichia coli*.

Cécile Crost, Frédéric Berthiaume, Annie Garrivier, Marie-Catherine Tessier, Harivony Rakotoharivonina, Josée Harel, Christine Martin

### article 2

Leucine responsive regulatory protein mediated repression of *clp* (encoding CS31A) expression by L-leucine and L-alanine in *Escherichia coli*.

Cécile Crost, Annie Garrivier, Josée Harel, Christine Martin

### article 3

Influence of L-alanine and L-leucine on methylation of GATC sites and Lrp binding to regulatory regions of the *foo* and *clp* operons.

Cécile Crost, Aurélie Caille, , Christine Martin, Josée Harel

## Leucine-Responsive Regulatory Protein-Mediated Repression of *clp* (Encoding CS31A) Expression by L-Leucine and L-Alanine in *Escherichia coli*

Cécile Crost,<sup>1,2</sup> Annie Garrivier,<sup>1</sup> Josée Harel,<sup>2</sup> and Christine Martin<sup>1\*</sup>

Laboratoire de Microbiologie, Institut National de la Recherche Agronomique, 63122 St-Genès-Champanelle, France,<sup>1</sup>  
and Département de Pathologie et Microbiologie, Université de Montréal, St-Hyacinthe QC J2S 7C6, Canada<sup>2</sup>

Received 16 July 2002/Accepted 16 December 2002

CS31A produced by septicemic and diarrheic *Escherichia coli* belongs to the Pap-regulatory family of adhesive factors, which are under methylation-dependent transcriptional regulation. Common features of operons encoding members of this family include two conserved GATC sites in the upstream regulatory region, and transcriptional regulators homologue to the PapB and PapI proteins. Methylation protection of GATC sites was previously shown to be dependent on the leucine-responsive regulatory protein (Lrp). Lrp and ClpB, the PapB equivalent, repressed *clp* basal transcription. A PapI homologue (AfaF) was required together with Lrp to establish the phase variation control, which gave rise to phase-ON cells that expressed CS31A and phase-OFF cells that did not express CS31A. In phase-OFF cells, the GATC<sub>dist</sub> site was methylated and the GATC<sub>prox</sub> site was protected from methylation, whereas in phase-ON cells, the inverse situation was found. Unlike Pap fimbriae, CS31A synthesis was dramatically reduced in media containing L-alanine or L-leucine. L-Alanine prevented the OFF-to-ON switch, locking *clp* expression in the OFF phase, whereas L-leucine repressed transcription without obvious effect on the switch frequency of phase variation. In phase-variable cells, leucine and alanine promoted methylation of GATC<sub>dist</sub> and methylation protection of GATC<sub>prox</sub>, increasing the methylation pattern characteristic of repressed cells. Furthermore, alanine prevented the AfaF-dependent methylation protection of GATC<sub>dist</sub> and thus the appearance of phase-ON cells. In addition, analysis of *clp* expression in a Lrp-negative background indicated that alanine and leucine also repressed *clp* transcription by a methylation-independent mechanism.

Lrp (leucine-responsive regulatory protein) is a global transcriptional regulator of metabolism in *Escherichia coli*. It affects the expression of a number of operons involved in amino acid biosynthesis and degradation, nutrient transport, and formation of fimbriae. Many of these operons are also subject to control by leucine and alanine. All the possible regulatory patterns in response to Lrp and leucine have been demonstrated. Lrp positively regulates some operons and negatively regulates others. In each category, leucine antagonizes the action of Lrp on certain operons and potentiates it on other operons. Some other positively or negatively regulated operons are insensitive to leucine. In a number of cases, alanine has been shown to have a similar effect to leucine (for reviews, see references 7 and 31). It has been shown that leucine antagonizes the activating action of Lrp on *ilvIH* and *gluBDF* promoters and the repressive action of Lrp on the *lysU* promoter by reducing the affinity of Lrp for its binding sites (13, 25, 37). To explain why some operons are insensitive to leucine even when the cell contains enough leucine to bind to Lrp, Ernsting et al. suggested that the effect of leucine on positively regulated genes depends on the effective in vivo concentration of Lrp (13). At high Lrp concentrations, Lrp binds to the promoters regardless of the presence or absence of leucine, whereas at low Lrp concentrations, the activities of these promoters is

leucine sensitive. If Lrp binds to different promoters with different affinities, the target genes with the lowest affinity for Lrp are the most sensitive to leucine. However, such a model does not explain how leucine can potentiate the action of Lrp.

Regulation of expression of fimbriae belonging to the P-regulatory family involves Lrp, which directly interacts with another regulatory protein encoded by the fimbrial operons, a PapI homologue. Expression of all the operons so far studied belonging to this family is insensitive to leucine, except for the *clp* and *foo* operons encoding CS31A and F165, fimbriae, respectively (19, 28). Fimbrial operons belonging to the P-regulatory family share important regulatory features. They are subject to phase variation control (except *fae*, encoding K88), defined as the ability of cells to switch in a reversible manner between fimbriated, phase-ON cells and afimbriated, phase-OFF cells. Lrp and a PapI homologue are required for the switch to occur (20, 26). The Lrp target regulatory region contains two GATC sites that are spaced 102 or 103 bp apart. The differential methylation status of these sequences determines the binding of Lrp, because Lrp binds only nonmethylated or hemimethylated GATC sites (34). PapI or its homologues have the capacity to displace Lrp from one binding site to another (24, 33). The activity of the promoter depends on the binding of Lrp, since Lrp activates expression when bound to certain sites and represses expression when bound to others (33, 38, 40). All operons also encode a PapB homologue that appears to play a dual role in the control of *pap* expression. Low levels of PapB activate *papI* transcription, whereas high levels suppress *papBA* expression (3, 18, 42). Distinct regula-

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie, Institut National de la Recherche Agronomique, 63122 St-Genès-Champanelle, France. Phone: (33) 4 73 62 42 47. Fax: (33) 4 73 62 45 81.

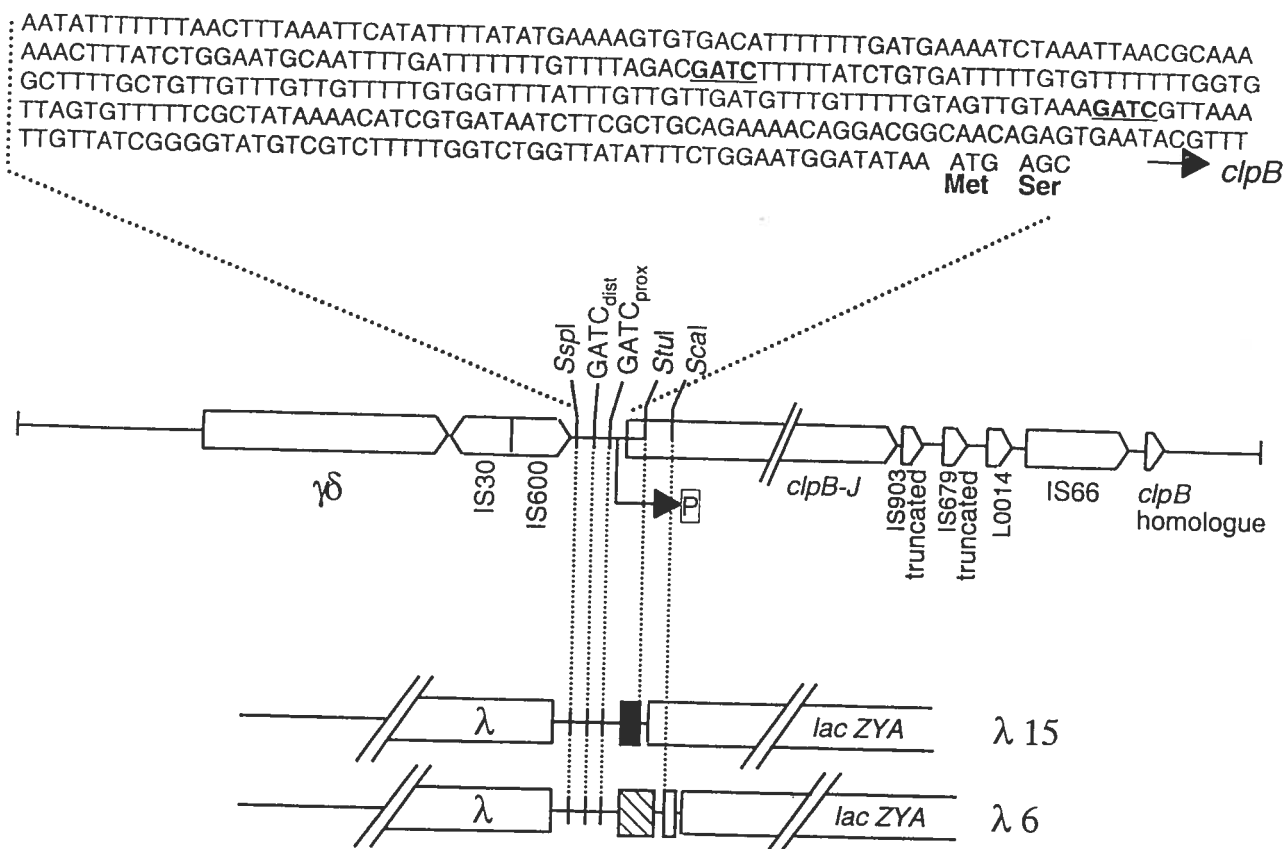


FIG. 1. The *clp* regulatory region, sequences surrounding the *clp* operon, and operon fusion constructs. The nucleotide sequence of the *clp* regulatory region is shown at the top, with the GATC sites in bold. The GenBank accession number for this sequence is L48184. The organization of DNA surrounding the *clp* operon is shown below the regulatory region. Boxes with arrowheads indicate the positions of sequences with high homologies to sequences present in data banks as found using the BLASTn program (National Center for Biotechnology Information). The operon fusion constructs are shown in expanded scale at the bottom. The *clpB* gene is truncated in  $\lambda$ 15 (black box) and is entire in  $\lambda$ 6 (hatched box). P indicates the putative *clp* promoter.

tory features can also be observed between members of the P-regulatory family. Null mutations in the *lrp* gene reduce the transcription of some operons, such as *pap*, *pef*, *sfa*, and *daa* (4, 32, 39), and increase the transcription of others, such as *clp* or *fae* (22, 28). PapI homologues activate the transcription of *pap*, *sfa*, *daa*, and *foo* (33, 39) and repress the transcription of *pef*, *fae*, and *clp* (22, 28, 32).

CS31A, encoded by the *clp* operon is produced by septicemic and enterotoxigenic bovine (9, 16) and human (23) *E. coli* strains. In *E. coli* reference strain 31A, CS31A is encoded by a high-molecular-weight plasmid called p31A. CS31A mediates adhesion to Caco-2 and Int-407 cells (12, 23), is required for full bacterial virulence in the rat model, and protects bacteria from phagocytosis by bovine polymorphonuclear neutrophils (J. P. Girardeau, personal communication). In the absence of phase variation, i.e., in the absence of a PapI homologue in the cells, Lrp and the specific regulator ClpB negatively control the basal *clp* expression. Under these conditions,  $GATC_{dist}$  is methylated whereas  $GATC_{prox}$  is protected from methylation. Lrp, but not ClpB, is required for methylation protection of  $GATC_{prox}$ . Methylation is required for repression (28). Leucine and alanine dramatically reduce CS31A production (16, 29). We have previously shown that alanine represses

basal *clp* transcription twofold in the absence of a PapI homologue and inhibits phase variation in its presence (28).

In this study, CS31A phase variation was examined using AfaF, a PapI equivalent. The influence of AfaF and Lrp on the methylation patterns and their role in phase variation were investigated. The influence of leucine and alanine on *clp* expression and on the methylation pattern was examined. As emphasized by Blomfield, changes in phase variation as opposed to steady-state control could have different outcomes on fimbriae production (1a). Thus, we tried to distinguish the effect of leucine and alanine on each process by studying the steady-state expression (i.e., the basal transcription) and the phase variation in the absence and presence of AfaF.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and media.** *E. coli* strains MC4100. $\lambda$ 6, MC4100. $\lambda$ 15, DL844. $\lambda$ 6, and DL844. $\lambda$ 15/I contain a single chromosomal copy of a *clp-lacZYA* fusion (see Fig. 1). The  $\lambda$ 6 lysogens contain an entire functional *clpB* gene, whereas *clpB* is truncated in the  $\lambda$ 15 lysogens (28). DL844. $\lambda$ 15/I was constructed as previously described to replace DL844. $\lambda$ 15 (28). The PCR assay described by Powell et al. (36) was used to verify that the four strains contained single lysogens. By this method, the DL844. $\lambda$ 15 strain used in a previous study (28) was shown to harbor more than one copy of the prophage, which was not detected by the  $\lambda$  terminase test (2) that was used previously. DL844 is an Lrp-negative

isogenic MC4100 strain (5). *ptrf1* and *pCLB99* are multicopy recombinant plasmids derived from *ptrc99A* (Pharmacia Biotech) and express *afaF* and *clpB*, respectively, under the control of the *trc* promoter (28). Luria-Bertani broth, Luria-Bertani agar, M9 minimal broth, and M9 minimal agar were prepared by the method of Miller (30). Glycerol as carbon source was added at 0.2% (wt/vol). Supplements, when appropriate, were used at the following concentrations: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal), 40  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG), 1 mM; L-leucine or L-alanine, 5 mM; ampicillin, 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; and kanamycin, 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. Isoleucine (0.4 mM) and valine (0.6 mM) were added to media containing 5 mM leucine. Cultures of strains harboring *ptrf1* were done without IPTG to avoid too high an expression of *afaF*.

**Assay of  $\beta$ -galactosidase activity.** A single bacterial colony picked on M9-glycerol agar plates containing X-Gal was used to inoculate an overnight culture in M9-glycerol medium. This culture was diluted 50-fold, grown to logarithmic phase (optical density at 600 nm, 0.5 to 0.8) in M9-glycerol medium supplemented with amino acids as indicated. Cultures were assayed for  $\beta$ -galactosidase activity as described previously (30). For strains showing phase variation, ON (blue) or OFF (white) colonies were picked from M9-glycerol-X-Gal plates as starting material for assays of activity of ON and OFF cultures, respectively. Each experiment was done in duplicate at least five times.

**Calculation of the switch frequency.** Lysogen strains were inoculated onto M9-glycerol-X-Gal plates supplemented with L-leucine or L-alanine or left unsupplemented. Colonies showing a uniform phenotype were resuspended in M9 salts. Appropriate dilutions were spread onto the same medium as the parent colony. After growth, the colonies were scored for a light blue or dark blue phenotype. The switch frequencies were calculated using the formula  $(M/N)/g$ , where  $M$  is the number of cells that underwent phase transition,  $N$  is the total number of cells evaluated, and  $g$  is the total number of generations, estimated to be 25, that gave rise to the colony.

**DNA sequencing.** For sequencing of DNA regions adjacent to the *clp* operon, the genome walker kit from Clontech Laboratories was used. p31A DNA was digested by restriction endonucleases that generate blunt ends and ligated to the adaptors provided in the kit as specified by the manufacturer. PCR amplification using the adaptor primer and a *clp*-specific primer allowed sequencing of unknown DNA fragments adjacent to *clp* without previous cloning. Templates for DNA sequencing were prepared using a PE Applied Biosystem dye terminator cycle-sequencing kit. Products were analyzed on an ABI Prism 310 DNA sequencer. Oligonucleotides were from Eurogentec or MWG Biotech.

**DNA hybridizations.** For chromosomal MC4100. $\lambda$ 6 DNA purification, a single blue or a single white colony was picked from M9-glycerol-X-Gal agar, resuspended in M9 salts, and used to inoculate three flasks containing the appropriate medium. Isoleucine (0.4 mM) and valine (0.6 mM) were added to the medium containing 5 mM leucine. Chromosomal DNA was isolated from overnight cultures using the DNeasy tissue kit (Qiagen). Aliquots of the cultures used for DNA purification were plated on the corresponding medium to calculate the percentage of ON cells. Digestions with restriction endonucleases *MboI* and *DpnI* were performed as specified by the manufacturer. DNA restriction fragments were separated by electrophoresis on 1.5% agarose in TBE buffer and transferred to a nylon membrane (Hybond N+; Amersham Biotech) in 20 $\times$  SSC (0.3 M sodium citrate, 0.33 M NaCl [pH 7.0]) using a vacuum blotter (Applied Gene). Transfer was carried out at 4.5 kPa for 60 min. DNA fragments were cross-linked to the filter with UV light by using a Spectrolinker (Spectronics Corp.). The filter was probed with digoxigenin-labeled DNA (240 bp) generated by PCR using the PCR DIG probe synthesis kit (Roche) and primers RU (5'-CCTGTTTGATTTTCGTGC-3') and RD (5'-CTGCAGCGAAGATTATC-3'). Hybridization was detected by chemiluminescence using CDP-Star (NEN) as a substrate for alkaline phosphatase. Quantification was performed by densitometry analysis using the Diversity DataBase software from Bio-Rad.

## RESULTS

**CS31A phase variation.** To analyze CS31A phase variation, we attempted to clone the *clp papI* homologue. By analogy to other fimbrial operons belonging to the P regulatory family, we supposed that the *papI* homologue would be present upstream or downstream next to the *clp* operon. However, nucleotide sequencing revealed that diverse insertion sequences and transposons flank the *clp* operon up to 7.8 kb upstream and 4.6 kb downstream. An open reading frame presenting 44% iden-

tity to the functional *clpB* gene is present 3 kb downstream of the *clp* operon but is isolated and also flanked by insertion sequences or unknown sequences (Fig. 1). Furthermore, our numerous efforts to clone the *papI* homologue from plasmid p31A were unsuccessful. PCR assays using *afaF*- or *papI*-derived primers failed to amplify a DNA fragment from p31A. A p31A DNA library was constructed and hybridized at high stringency with a 400-bp *afaF* probe (28). Hybridization was found only with a 65-bp sequence derived from an insertion sequence. No more hybridization was found after deletion of this sequence in the probe, even at low stringency. Transformation of p31A in MC4100. $\lambda$ 6 or MC4100. $\lambda$ 15 failed to restore phase variation. Either this gene indeed exists on p31A and we were not able to clone it, or CS31A phase variation is controlled by a *PapI* homologue encoded to a related chromosomally located operon. We therefore decided to analyze CS31A phase variation by using in *trans* AfaF, the *PapI* homologue belonging to the *afa-3* gene cluster. Afa-3 is a nonfimbrial adhesin (15) with a structural organization more closely related to CS31A than to P-fimbriae. AfaF was chosen because the ClpB and AfaA regulators (*PapB* homologues) have 60.6% amino acid sequence identity (28). Furthermore, we have shown previously that plasmid *ptrf1*, harboring *afaF* under the control of the *trc* promoter, promotes phase variation when introduced into *E. coli* strains harboring *clp-lacZYA* transcriptional fusions (28). To study transcriptional *clp* regulation, we used different strains that harbor a single chromosomal *clp-lacZYA* transcriptional fusion, with ( $\lambda$ 6 lysogens) or without ( $\lambda$ 15 lysogens) an intact *clpB* gene (Fig. 1). The fusions were created either in MC4100 *E. coli* or in DL844 *E. coli* to provide Lrp<sup>+</sup> or Lrp<sup>-</sup> backgrounds, respectively. As already demonstrated, uniform blue colonies arose by plating  $\lambda$ 6 or  $\lambda$ 15 lysogens on M9-glycerol plates containing X-Gal in the absence of AfaF (28). Table 1 shows that ClpB and Lrp regulated the *clp* basal transcription even in the absence of the phase variation control (i.e., in the absence of AfaF): comparison of DL844. $\lambda$ 6 (493 MU) with MC4100. $\lambda$ 6 (112 Miller units [MU]) showed that Lrp played a repressive role. Similarly, comparison of MC4100. $\lambda$ 15 (775 MU) with MC4100. $\lambda$ 6 (112 MU) showed that ClpB also played a repressive role, which was previously demonstrated in MC4100. $\lambda$ 15 complemented in *trans* by pCLB99, a multicopy plasmid expressing *clpB* under the control of the *trc* promoter (28). It is not clear why the transcription was not totally derepressed in the DL844. $\lambda$ 15/1 strain, which lacks Lrp and ClpB (see Discussion). After the plasmid encoding AfaF was introduced into the strains, phase variation occurred only in the Lrp<sup>+</sup> backgrounds, with emergence of a majority of white colonies among the blue ones, indicating a global repressive effect. Measurements of the  $\beta$ -galactosidase activity of Lac<sup>+</sup> (phase-ON) and Lac<sup>-</sup> (phase-OFF) colonies are reported in Table 1. Transcription was highly repressed in phase-OFF cells (18 and 38 MU in ClpB<sup>+</sup> and ClpB<sup>-</sup> strains, respectively). When AfaF was overexpressed due to the addition of 1 mM IPTG to the growth medium, the colonies presented a uniform Lac<sup>-</sup> phenotype on M9-glycerol-X-Gal agar plates, indicating that transcription of *clp-lacZ* was completely inactive (data not shown). Without Lrp, transcription was locked in the ON phase [DL844. $\lambda$ 6(*ptrf1*), 338 MU]. Thus, Lrp was required for repression of the promoter and emergence of phase-OFF cells. However, when we took into account the

TABLE 1. Transcription levels of *clp-lacZYA* in different media and different genetic backgrounds

Strain	Genotype	Growth medium <sup>a</sup>	Starting colony	Switch frequency		$\beta$ -Galactosidase activity (MU) <sup>c</sup>	% of phase-ON cells
				ON to OFF	OFF to ON		
MC4100. $\lambda$ 6	<i>clpB</i> <sup>+</sup> <i>lrp</i> <sup>+</sup> <i>afaF</i>	M9	U <sup>b</sup>			112 $\pm$ 9	
		M9-alanine	U			36 $\pm$ 3	
		M9-leucine	U			53 $\pm$ 7	
MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1)	<i>clpB</i> <sup>+</sup> <i>lrp</i> <sup>+</sup> <i>afaF</i> <sup>+</sup>	M9	Phase ON	3.16 $\times 10^{-2}$		87 $\pm$ 21	21.1
			Phase OFF		1.47 $\times 10^{-3}$	18 $\pm$ 5	3.68
		M9-leucine	Phase ON	3.24 $\times 10^{-2}$		10 $\pm$ 3	19.12
			Phase OFF		1.81 $\times 10^{-3}$	8 $\pm$ 3	4.53
DL844. $\lambda$ 6	<i>clpB</i> <sup>+</sup> <i>lrp</i> <i>afaF</i>	M9	U			493 $\pm$ 59	
		M9-alanine	U			197 $\pm$ 39	
		M9-leucine	U			250 $\pm$ 3	
DL844. $\lambda$ 6(ptrf1)	<i>clpB</i> <sup>+</sup> <i>lrp</i> <i>afaF</i> <sup>+</sup>	M9	U			338 $\pm$ 57	
		M9-alanine	U			163 $\pm$ 33	
		M9-leucine	U			200 $\pm$ 66	
MC4100. $\lambda$ 15	<i>clpB</i> <i>lrp</i> <sup>+</sup> <i>afaF</i>	M9	U			775 $\pm$ 60	
		M9-alanine	U			170 $\pm$ 20	
		M9-leucine	U			238 $\pm$ 71	
MC4100. $\lambda$ 15(ptrf1)	<i>clpB</i> <i>lrp</i> <sup>+</sup> <i>afaF</i> <sup>+</sup>	M9	Phase ON	2.37 $\times 10^{-2}$		336 $\pm$ 144	40.35
			Phase OFF		1.15 $\times 10^{-3}$	38 $\pm$ 11	2.96
		M9-alanine	U			11 $\pm$ 4	
		M9-leucine	Phase ON	2.64 $\times 10^{-2}$		152 $\pm$ 30	33.6
			Phase OFF		1.16 $\times 10^{-3}$	31 $\pm$ 4	2.91
DL844. $\lambda$ 15/1	<i>clpB</i> <i>lrp</i> <i>afaF</i>	M9	U			276 $\pm$ 36	
		M9-alanine	U			202 $\pm$ 28	
		M9-leucine	U			295 $\pm$ 47	
DL844. $\lambda$ 15/1(ptrf1)	<i>clpB</i> <i>lrp</i> <i>afaF</i> <sup>+</sup>	M9	U			278 $\pm$ 81	
		M9-alanine	U			221 $\pm$ 44	
		M9-leucine	U			290 $\pm$ 26	

<sup>a</sup> Glycerol is the carbon source. Media containing leucine are supplemented with isoleucine (0.4 mM) and valine (0.6 mM).

<sup>b</sup> U, uniform phenotype of the colonies.

<sup>c</sup> Results are the means  $\pm$  standard deviations of at least five independent experiments made in duplicate.

fraction of phase ON cells in the MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1) colonies, it appeared that the transcription level of phase-ON cells was higher than in the absence of AfaF (87 MU for 21% of phase ON-cells versus 112 MU for 100% of phase-ON cells). Since AfaF had no regulatory effect in an *Lrp*<sup>−</sup> background [Table 1, DL844. $\lambda$ 15/1 versus DL844. $\lambda$ 15(ptrf1)], our data suggest that AfaF modulated the regulatory activity of *Lrp* by increasing its repressive effect in a large fraction of cells (phase OFF) and by conferring to it an activating activity in the remaining fraction (phase ON). In contrast, *ClpB* was not required for the phase variation to occur. The *ClpB*-dependent repression was still effective in phase-ON cells [compare MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1) to MC4100. $\lambda$ 15(ptrf1)]. However, results obtained with MC4100. $\lambda$ 15(ptrf1) were difficult to analyze: while *Lac*<sup>−</sup> colonies were really white, *Lac*<sup>+</sup> colonies presented all the gradations of blue, leading to a fraction of phase-ON cells in a *Lac*<sup>+</sup> colony that varied greatly from one experiment to another [which was not the case for MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1)], ranging from 6 to 78%. Such a variability has already been observed in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium populations expressing *Pef* fimbriae (32), but it remains unexplained.

**Influence of leucine and alanine on *clp* expression.** Because CS31A is one of the only two known P-related fimbriae sensi-

tive to leucine and alanine, we analyzed in further detail the effect of these amino acids on *clp* transcription. Alanine abolished *clp* transcription, locking cells in phase OFF (Table 1). In contrast, leucine did not dramatically alter the switch frequency of phase variation. We measured the  $\beta$ -galactosidase activity in different strain backgrounds starting either from a *Lac*<sup>+</sup> or from a *Lac*<sup>−</sup> colony grown on M9-glycerol-X-Gal with L-alanine or L-leucine (Table 1). Alanine and, to a lesser extent, leucine dramatically decreased *clp* transcription in MC4100. $\lambda$ 6 and MC4100. $\lambda$ 15 strains in the presence and absence of AfaF. Repression was also observed in the *Lrp*<sup>−</sup> *ClpB*<sup>+</sup> (DL844. $\lambda$ 6) backgrounds with and without AfaF. However, in the simultaneous absence of *ClpB* and *Lrp* [DL844. $\lambda$ 15(ptrf1) and DL844. $\lambda$ 15], neither leucine nor alanine repressed *clp* transcription.

**DNA methylation pattern analysis.** In the absence of AfaF (i.e., in the absence of phase variation), the GATC<sub>dist</sub> site was methylated and the GATC<sub>prox</sub> site was protected from methylation in about 50% of the DNA molecules whereas both GATC<sub>dist</sub> and GATC<sub>prox</sub> sites were methylated in the remaining 50% of DNA molecules. This methylation pattern was similar in *ClpB*<sup>+</sup> and *ClpB*<sup>−</sup> strains. In an *Lrp*<sup>−</sup> background, both GATC sites were methylated in 100% of the molecules (28). By analogy

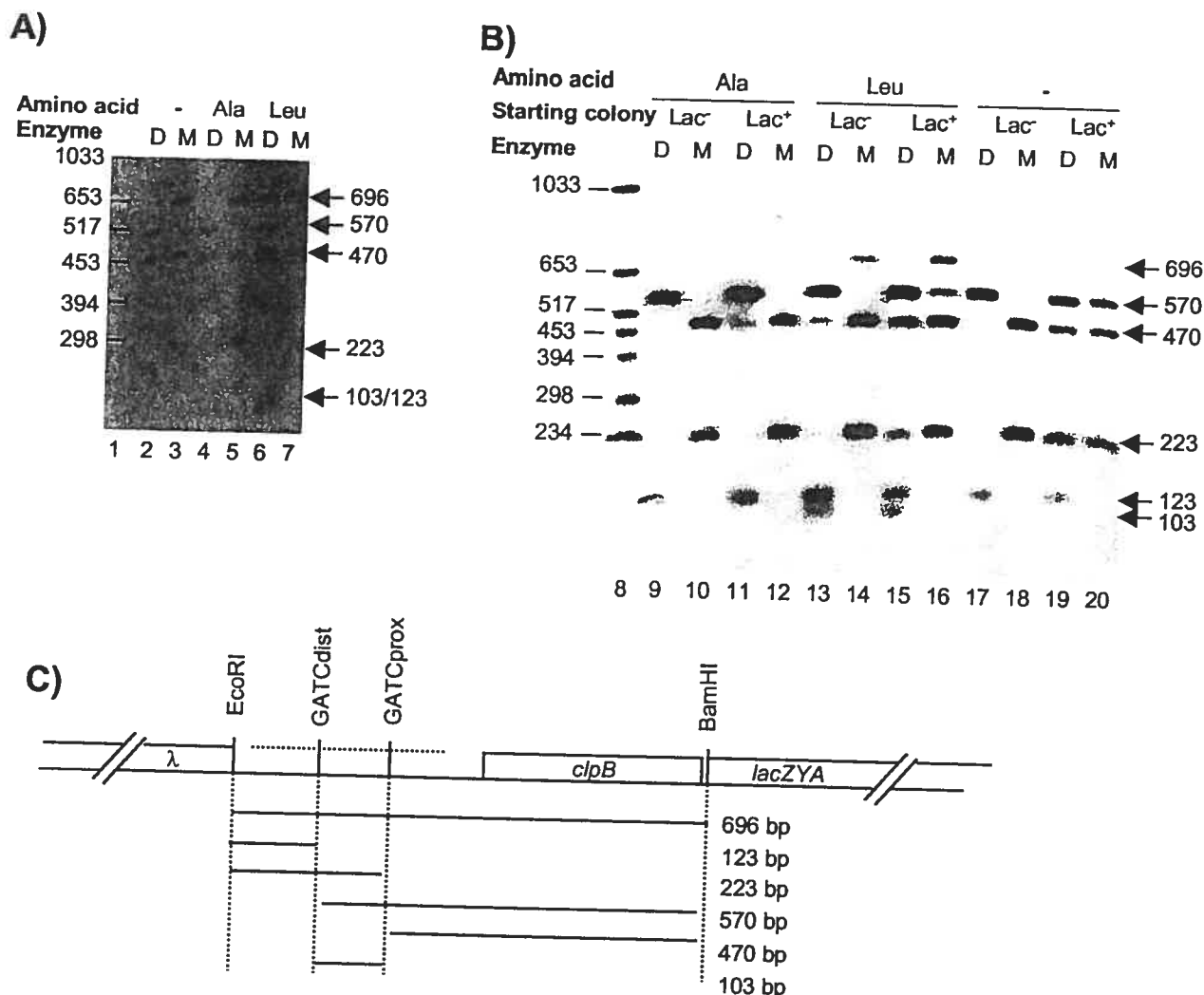


FIG. 2. Analysis of the in vivo GATC methylation states of the *clp* regulatory region. A Southern blot of chromosomal DNA obtained from MC4100.λ6 (A) and MC4100.λ6(ptrf1) (B) grown in M9-glycerol (lanes 2, 3, and 17 to 20), in M9-glycerol plus alanine (lanes 4, 5, and 13 to 16), or in M9-glycerol plus leucine, isoleucine, valine (lanes 6, 7, and 9 to 12) is shown. For MC4100.λ6, a colony grown on M9-glycerol was chosen at random among uniform colonies as the starting material. For MC4100.λ6(ptrf1), a *Lac*<sup>-</sup> and a *Lac*<sup>+</sup> colony were used as the starting material. The DNA was digested with *Bam*HI plus *Eco*RI and either *Dpn*I (D) or *Mbo*I (M). DNA hybridization was carried out with the digoxigenin-labeled probe indicated in panel C by a horizontal dotted line. The digoxigenin-labeled DNA molecular weight marker VI (Roche) was loaded in lanes 1 and 8. Its fragment sizes are indicated on the left. Size of DNA fragments that hybridized with the probe are shown on the right. (C) Schematic representation of DNA fragments that may hybridize with the probe.

to *pap*, it was concluded that Lrp was bound to the GATC<sub>prox</sub> site in 50% of the molecules and that the affinity of Lrp for GATC<sub>prox</sub> is stronger than for GATC<sub>dist</sub>. To determine whether AfaF, leucine, or alanine modifies the methylation pattern, we performed Southern analyses on MC4100.λ6 and MC4100.λ6(ptrf1) DNA. Single colonies cultured on M9-glycerol-X-Gal were used to inoculate M9-glycerol supplemented with the amino acids or left unsupplemented. For MC4100.λ6(ptrf1), inoculation was done with either a *Lac*<sup>+</sup> or a *Lac*<sup>-</sup> colony. The corresponding percentage of phase-ON cells was calculated. MC4100.λ6 cells presented a uniform phenotype; therefore, a single colony was picked at random. DNA was digested with *Dpn*I, which cuts only methylated GATC sites, or *Mbo*I, which cuts only nonmethylated GATC sites, and hybridized with a digoxigenin DNA probe that encompasses the two GATC sites (Fig. 2). The results obtained (Fig. 2) are schematically

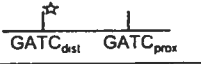

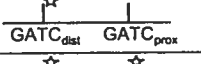
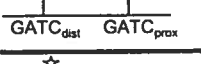
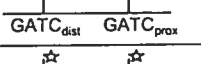
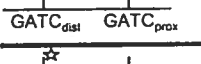
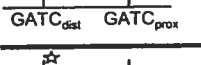
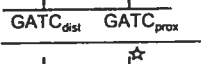
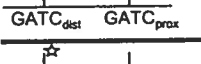
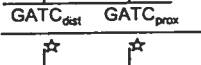
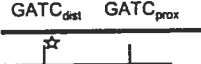
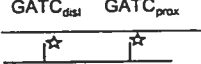
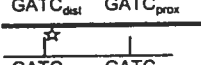
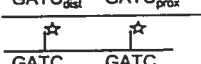
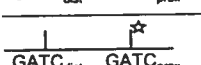
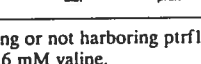
represented in Table 2.

In the absence of AfaF and the presence of alanine, fewer than 40% of the DNA molecules presented methylation protection of GATC<sub>prox</sub> (Fig. 2; Table 2), suggesting that alanine slightly lowered the affinity of Lrp for its target GATC<sub>prox</sub> site. Leucine altered the methylation pattern in the same way, but its effect was more drastic since only 25% of the DNA molecules were protected from methylation on GATC<sub>prox</sub>.

In the presence of AfaF, the DNA molecules from a *Lac*<sup>-</sup> colony cultured in M9-glycerol-X-Gal showed methylated GATC<sub>dist</sub> sites whereas GATC<sub>prox</sub> sites were protected from methylation. Since 94% of the colonies presented a *Lac*<sup>-</sup> phenotype, we can assume that this methylation pattern is characteristic of phase-OFF cells and that the method was not sensitive enough to detect molecules corresponding to fewer than 6% of the cells. DNA molecules from a *Lac*<sup>+</sup> colony presented two methylation



TABLE 2. Methylation patterns of the *clp* regulatory region

Starting colony and growth medium <sup>a</sup>	Methylation pattern <sup>b</sup>	% of DNA molecules	% of Lac <sup>+</sup> cells	% of Lac <sup>-</sup> cells
AfaF <sup>-</sup> , M9		48.5	NA <sup>c</sup>	NA
		51.5		
AfaF <sup>-</sup> , M9-alanine		36.5	NA	NA
		63.5		
AfaF <sup>-</sup> , M9-leucine		24.5	NA	NA
		75.5		
AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>-</sup> , M9		100	6	94
		62	44	56
AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup> , M9		37		
		95		100
AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>-</sup> or AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup> M9-alanine		5		
		89	5	95
AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>-</sup> , M9-leucine		11		
		65		
AfaF <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup> , M9-glycerol leucine		21	12	88
		13		

<sup>a</sup> The strain used is MC4100.Δ6 (ClpB<sup>+</sup> Lrp<sup>+</sup>) harboring or not harboring ptrf1 (AfaF<sup>+</sup> and AfaF<sup>-</sup>, respectively). The carbon source is glycerol. Media containing leucine are supplemented with 0.4 mM isoleucine and 0.6 mM valine.

<sup>b</sup> Stars indicate methylation of GATC.

<sup>c</sup> NA, not applicable (cells present a uniform phenotype).

patterns: 62% of the molecules showed the methylation pattern characteristic of phase-OFF cells, and 37% of the molecules showed the opposite pattern, with GATC<sub>dist</sub> protected from methylation and with methylated GATC<sub>prox</sub> sites. These patterns correlated well with the 56% Lac<sup>-</sup> colonies and 44% Lac<sup>+</sup> colonies observed in the culture. Thus, we can assume that the characteristic pattern of phase-ON cells is GATC<sub>dist</sub> protected from methylation and GATC<sub>prox</sub> methylated. Comparison of the methylation patterns of the AfaF<sup>-</sup> and AfaF<sup>+</sup> cells grown in M9-glycerol suggests that AfaF increased the affinity of Lrp for GATC<sub>prox</sub>, producing highly repressed phase-OFF cells, and that in a small proportion of cells, AfaF allowed Lrp binding to GATC<sub>dist</sub>, producing activated phase-ON cells. Together with measurement of β-galactosidase activities, our results indicate that maximal repression requires Lrp binding to

GATC<sub>prox</sub> and maximal activation Lrp binding to GATC<sub>dist</sub>. When alanine was added to the growth medium, 100% of the colonies appeared Lac<sup>-</sup>. This phenotype correlated well with 95% of the DNA molecules presenting the methylation pattern characteristic of phase-OFF cells and 5% being fully methylated. Leucine had a less drastic effect on *clp* transcription since phase variation still occurred. The Lac<sup>-</sup> colony presented the same methylation patterns as the colonies cultured in alanine and was composed of 95% of Lac<sup>-</sup> cells. The Lac<sup>+</sup> colony presented 12% Lac<sup>+</sup> cells, and 13% of the DNA molecules showed the methylation pattern characteristic of phase-ON cells in addition to the two methylation patterns observed in the Lac<sup>-</sup> colony. Comparison of the methylation patterns with and without the amino acids shows that leucine decreased and alanine prevented the AfaF-dependent methyl-

ation protection of GATC<sub>dist</sub>. In consequence, alanine prevented the emergence of phase-ON cells. Furthermore, alanine increased the methylation protection of GATC<sub>prox</sub> since 95% of the DNA molecules from AfaF<sup>+</sup> cells presented GATC<sub>prox</sub> protected from methylation in the presence of alanine instead of 62% in its absence.

## DISCUSSION

CS31A, encoded by the *clp* operon, belongs to the P-regulatory family of fimbriae. Its expression is subject to a tight control at the transcriptional level, mediated by the global regulator Lrp, as well as by two specific regulators, ClpB and a PapI homologue, and is dramatically repressed by L-leucine and L-alanine. Leucine bound to Lrp modulates the expression of a number of operons by altering the affinity of Lrp for its target sites. In some cases, alanine plays the same role as leucine. The mode of action of leucine on operons subjected to phase variation control, involving an Lrp binding protein of the PapI family, has not been investigated until now. The intensively studied *pap* operon is insensitive to leucine, and CS31A and F165<sub>1</sub> are the only two fimbriae of the P-regulatory family known to be responsive to leucine and alanine. In this study, we investigated the molecular mechanisms of the phase variation control and the influence of leucine and alanine on *clp* expression by analyzing their effects (i) on the *clp* promoter, which is repressed by Lrp and ClpB independently of phase variation, and (ii) on phase variation, which is mediated by Lrp and the PapI homologue AfaF.

AfaF was used in this study because our numerous efforts to clone the homologous PapI homologue from the p31A virulence plasmid were unsuccessful. These results suggest that p31A does not harbor a *clp* specific homologue to *papI*. The phase variation control observed in wild-type strains could result from a cross talk between *clp* and a chromosomal *pap*-related operon. Recently it has been shown that the reference strain 31A encodes P fimbriae (1). Whether PapI encoded by this *pap* operon indeed cross-regulates *clp* transcription has not yet been investigated. Functional complementation with heterologous PapI homologues has already been demonstrated: PefI expressed from a multicopy plasmid activates *papBA* transcription in *E. coli* whereas it represses *pef* transcription in *S. enterica* serovar Typhimurium (32), and PapI, which is a positive regulator of *pap* transcription, represses K88 production, as does the homologous FaeA regulator (22). SfaC and DaaF, controlling the production of S and F1845 fimbriae, respectively, are also functional PapI homologues (17, 39). Therefore, it was rational to assume that AfaF would regulate *clp* expression in the same manner as would the homologous Clp regulator.

A regulatory model for *clp* expression may be proposed (Fig. 3). We have shown previously that both GATC sites are methylated in the absence of Lrp and that methylation protection of these sites requires Lrp but does not require ClpB (28). By analogy to Pap, we postulate that Lrp protects the GATC sites from methylation and cannot bind methylated GATC sites. Lrp presents a lower affinity for GATC<sub>dist</sub> than for GATC<sub>prox</sub>. The *clp* basal transcription level is low due to the repression exerted by ClpB and Lrp, which is bound to GATC<sub>prox</sub> (Fig. 3A). Leucine and alanine decrease the affinity of Lrp for GATC<sub>prox</sub> and repress *clp* basal transcription by a noncharac-

terized Lrp-independent mechanism (Fig. 3B). AfaF, the PapI homologue, is required for Lrp to bind GATC<sub>dist</sub> and increases the affinity of Lrp for GATC<sub>prox</sub>, so that phase variation can occur. The methylation pattern characteristic of phase-ON cells is GATC<sub>dist</sub> protected from methylation and GATC<sub>prox</sub> methylated (Fig. 3C), whereas the methylation pattern characteristic of phase-OFF cells is the opposite (GATC<sub>dist</sub> methylated and GATC<sub>prox</sub> protected) (Fig. 3D). Leucine lowers and alanine prevents Lrp binding to GATC<sub>dist</sub>. Leucine and alanine thus appear as antagonists of AfaF for Lrp binding to GATC<sub>dist</sub>. By contrast, alanine acts in conjunction with AfaF to increase Lrp binding to GATC<sub>prox</sub>, so that cells are locked in a highly repressed OFF phase independently of ClpB. Whether maximal repression by alanine also involves the Lrp-independent mechanism cannot be determined (Fig. 3E).

According to this model, a high level of transcription should be expected in the simultaneous absence of Lrp, ClpB, and AfaF (DL844.λ15/1), but this was not the case (276 MU). It has been shown that *pap* transcription is highly repressed by H-NS in the absence of Lrp (38). We could hypothesize that *clp* transcription is moderately repressed by H-NS or another unidentified regulatory protein in the absence of Lrp and ClpB. This repression could be alleviated by Lrp or ClpB individually but amplified by the simultaneous action of Lrp and ClpB.

Without AfaF, about 50% of the DNA molecules were methylated on both GATC sites whereas in the other 50%, GATC<sub>prox</sub> was protected from methylation. Thus, under these conditions all GATC<sub>dist</sub> sites were methylated. A hypothesis to explain this result is that Lrp by itself has no affinity for GATC<sub>dist</sub> and that Dam and Lrp bind equally to GATC<sub>prox</sub>, so that at each replication cycle, Lrp binds to half of the GATC<sub>prox</sub> sites. This pattern was not observed in the presence of AfaF. AfaF by itself had no direct effect on *clp* transcription. Rather, it modified the affinity of Lrp for the GATC sites. In phase-OFF cells, AfaF increased Lrp binding to GATC<sub>prox</sub>, so that this site was protected from methylation in 100% of the DNA molecules, leading to a highly repressed state. In phase-ON cells, AfaF allows Lrp binding to GATC<sub>dist</sub>. Thus, Lrp plays dual roles as both an AfaF-dependent activator (when bound to GATC<sub>dist</sub>) and a repressor (when bound to GATC<sub>prox</sub>) of *clp* transcription, similar to its role with the *pap* operon (38). GATC<sub>dist</sub> and GATC<sub>prox</sub> could be considered activator and repressor sites, respectively. However, *pap* expression is totally abrogated in the absence of PapI (41) whereas *clp* transcription is active in the absence of AfaF. High levels of PapI increase *pap* transcription (34, 38), whereas high levels of AfaF abrogate *clp* expression. Similarly, transcription of *pef* (Pef pili in *S. enterica* serovar Typhimurium) is repressed by PefI, the PapI/AfaF counterpart (32). To explain these differences, Hernday et al. (21) suggested that the binding of Lrp to *pef* sites around GATC<sub>dist</sub> would occur with the highest affinity, with PefI facilitating the transition to the OFF state by movement of Lrp to sites around GATC<sub>prox</sub>. Clearly, this is not the case for *clp*, as demonstrated by our results. The differences between *clp* and *pap* expression could, instead, be due to different Lrp-binding sites, to divergent nucleotide sequences surrounding the GATC sites, and to the different action of the other regulatory proteins on the promoter region. Indeed, ClpB is a repressor of *clp* expression whereas PapB at physiological levels has no direct influence on the *papBA* promoter.

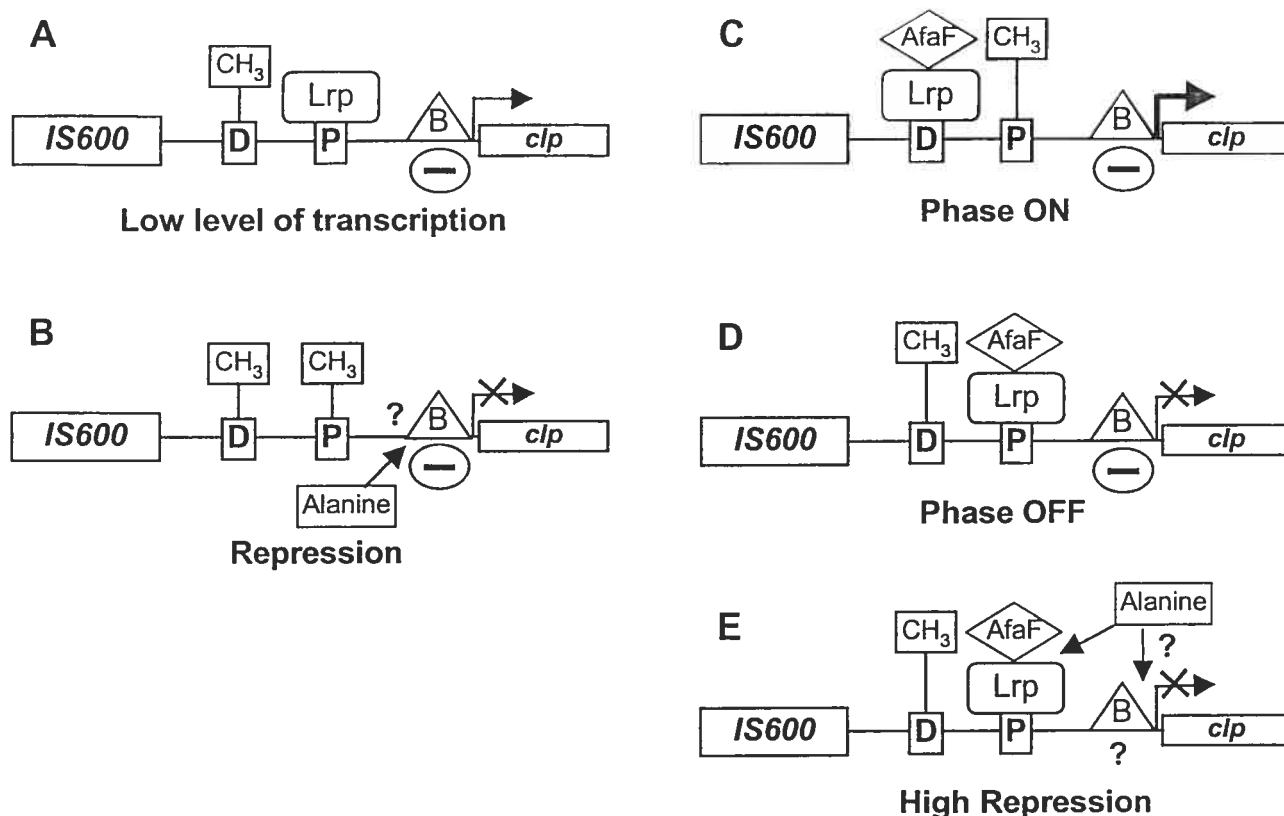


FIG. 3. Model for control of *clp* expression by Lrp, AfaF, ClpB, and alanine. D and P in open squares represent GATC<sub>dist</sub> and GATC<sub>prox</sub> sites, respectively. B in a triangle represents ClpB. The minus sign in an oval indicates a repressive effect on *clp* basal transcription. (A) Low level of basal transcription in the absence of AfaF and alanine; GATC<sub>dist</sub> is methylated, whereas Lrp is bound to GATC<sub>prox</sub>; ClpB is bound near to the promoter region. (B) Alanine represses the basal transcription independently of Lrp by an unknown mechanism and decreases Lrp binding to GATC<sub>prox</sub>. (C and D) AfaF bound to Lrp allows Lrp binding to GATC<sub>dist</sub> in phase-ON cells (C) and increases Lrp binding to GATC<sub>prox</sub> in phase-OFF cells (D). (E) Alanine prevents the Lrp-AfaF complex from binding to GATC<sub>dist</sub> and increases its binding to GATC<sub>prox</sub>, locking cells in the OFF phase.

Transcription of *pap* but not of *clp* requires Lrp binding to GATC<sub>dist</sub> (6, 38) and is highly repressed by H-NS in the absence of Lrp (38). In contrast, the *clp* promoter is moderately active in the absence of Lrp, ClpB, and AfaF, suggesting that H-NS or another unidentified regulatory protein acts as a repressor of *clp* expression less efficiently than does Lrp or ClpB.

Among fimbriae belonging to the P-regulatory family, only CS31A and F165<sub>1</sub> respond to leucine and alanine levels (10, 19, 28). The synthesis of K99 and type 1 fimbriae is also sensitive to leucine and alanine (11, 14). However, expression of these fimbriae is controlled by a mechanism involving Lrp but is distinct from that of members of the P-regulatory family, and the mode of action of leucine and alanine is not well understood. Two mechanisms by which leucine and alanine repress *clp* transcription were evidenced in this study. First, alanine and leucine repressed the basal transcription about twofold in the absence of Lrp, and this repression required ClpB (Table 1). Second, alanine and leucine altered the methylation patterns in the presence of Lrp, suggesting that they modified the affinity of Lrp for its target sites: in the absence of AfaF, alanine and leucine increased methylation of GATC<sub>prox</sub> (Table 2). This leads to an increase in the amount of fully methylated DNA. However, fully methylated DNA is probably not associated with the repression of *clp* expression, since *clp* transcrip-

tion is active in an Lrp-negative background (Table 1). This indicates that the twofold repression observed in the absence of AfaF is due mainly to the Lrp-independent mechanism. In the presence of AfaF, alanine prevented and leucine decreased the AfaF-dependent methylation protection of GATC<sub>dist</sub>, acting as antagonists of AfaF. In addition, alanine acted in conjunction with AfaF to increase methylation protection of GATC<sub>prox</sub>. These results suggest that alanine and leucine decreased Lrp binding to the site with the lowest affinity (GATC<sub>dist</sub>) and increased or had no effect, respectively, on Lrp binding to the site with the highest affinity (GATC<sub>prox</sub>).

It has been shown that leucine antagonizes the activating action of Lrp on *ilvIH* and *gluBDF* promoters and its repressive effect on the *lysU* promoter by reducing the affinity of Lrp for its binding sites (13,25,37). Zhi et al. (43) have identified Lrp-binding sites in the *dadAX* promoter region. Lrp sites that overlap the *dad* promoters are involved in repression, whereas sites upstream of the promoters are required for activation. Leucine and alanine, which activate *dad* expression, decrease the affinity of Lrp to repressor sites while having little or no effect on the binding of Lrp to activator sites. The inverse situation is found in *clp* expression: leucine or alanine, which repress *clp* expression, increase the methylation protection of the repressor site (GATC<sub>prox</sub>) and dramatically reduce the

methylation protection of the activator site (GATC<sub>dist</sub>). Since methylation protection is very probably due to Lrp binding, in both cases leucine or alanine decreases the binding of Lrp to low-affinity sites. However, in the case of *clp*, an extra protein (AfaF) is required to increase the affinity of Lrp for the repressor site, and leucine and alanine appear as agonists of AfaF. Direct interaction between leucine and Lrp has been demonstrated (27), and Lrp mutations which cause Lrp to be insensitive to leucine have been identified (35). It has been shown that Lrp self-associates in vitro to form a hexadecamer and an octamer and that leucine induces the dissociation of the Lrp hexadecamer to an octamer (8). The authors proposed a model for operons for which the effects of Lrp are potentiated by leucine: the Lrp octamer would bind with moderate affinity, and leucine would potentiate the effect of Lrp by increasing the amounts of leucine-bound octamers. However, the Lrp-mediated regulation of *clp* expression is even more complex, since Lrp binding requires an extra protein such as AfaF.

## REFERENCES

- Bertin, Y., J. P. Girardeau, A. Darfeuille-Michaud, and C. Martin. 2000. Epidemiological study of *pap* genes among diarrheagenic *Escherichia coli* strains producing CS31A and F17 adhesins, and characterization of the Pap31A fimbriae. *J. Clin. Microbiol.* 38:1502-1509.
- Blomfield, I. C. 2001. The regulation of *pap* and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Adv. Microb. Physiol.* 45:1-49.
- Blyn, L. B., B. A. Braaten, and D. A. Low. 1990. Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential dam methylation states. *EMBO J.* 9:4045-4054.
- Blyn, L. B., B. A. Braaten, C. A. White-Ziegler, D. H. Rolfson, and D. A. Low. 1989. Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional regulation. *EMBO J.* 8:613-620.
- Braaten, B. A., L. B. Blyn, B. S. Skinner, and D. A. Low. 1991. Evidence for a methylation-blocking factor (*mbf*) locus involved in *pap* pilus expression and phase variation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:1789-1800.
- Braaten, B. A., X. Nou, L. S. Kaltenbach, and D. A. Low. 1994. Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* 76:577-588.
- Braaten, B. A., J. V. Platko, M. W. van der Woude, B. H. Simons, F. K. de Graaf, J. M. Calvo, and D. A. Low. 1992. Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the *pap* and *fan* pili operons in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4250-4254.
- Calvo, J. M., and R. G. Matthews. 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58:466-490.
- Chen, S., M. H. Rosner, and J. M. Calvo. 2001. Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 312:625-635.
- Contrepolis, M., H. C. Dubourguier, A. L. Parodi, J. P. Girardeau, and J. L. Ollier. 1976. Septicemic *Escherichia coli* and experimental infections of calves. *Vet. Microbiol.* 12:109-118.
- Daigle, F., C. Forget, C. Martin, M. Drolet, M. C. Tessier, H. Dezfoulian, and J. Harel. 2000. Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicemia in pigs. *Res. Microbiol.* 151:563-574.
- de Graaf, F. K., P. Klaasen-Boor, and J. E. van Hees. 1980. Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. *Infect. Immun.* 30:125-128.
- Di Martino, P., Y. Bertin, J. P. Girardeau, V. Livrelli, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud. 1995. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.* 63:4336-4344.
- Ernsting, B. R., J. W. Denninger, R. M. Blumenthal, and R. G. Matthews. 1993. Regulation of the *glbBDF* operon of *Escherichia coli*: how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? *J. Bacteriol.* 175:7160-7169.
- Gally, D. L., J. A. Bogan, B. I. Eisenstein, and I. C. Blomfield. 1993. Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J. Bacteriol.* 175:6186-6193.
- Garcia, M. I., P. Gounon, P. Courcoux, A. Labigne, and C. Le Bouguenec. 1996. The fimbrial adhesive sheath encoded by the *afa-3* gene cluster of pathogenic *Escherichia coli* is composed of two adhesins. *Mol. Microbiol.* 19:683-693.
- Girardeau, J. P., M. Der Vartanian, J. L. Ollier, and M. Contrepolis. 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 56:2180-2188.
- Goransson, M., K. Forsman, and B. E. Uhlin. 1988. Functional and structural homology among regulatory cistrons of pili-adhesin determinants in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 212:412-417.
- Goransson, M., P. Forsman, P. Nilsson, and B. E. Uhlin. 1989. Upstream activating sequences that are shared by two divergently transcribed operons mediate cAMP-CRP regulation of pilus-adhesin in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3:1557-1565.
- Harel, J., F. Daigle, C. Forget, M. C. Tessier, C. Crost, and C. Martin. 2000. Phase variation of F165(1) (Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicemia in animals. *Can. J. Microbiol.* 46:1101-1107.
- Henderson, I. R., P. Owen, and J. P. Nataro. 1999. Molecular switches—the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol. Microbiol.* 33:919-932.
- Hernday, A., M. Krabbe, B. Braaten, and D. Low. 2002. Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(Suppl. 4):16470-16476.
- Huisman, T. T., D. Bakker, P. Klaasen, and F. K. de Graaf. 1994. Leucine-responsive regulatory protein, IS1 insertions, and the negative regulator FaeA control the expression of the *fae* (K88) operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 11:525-536.
- Jallat, C., A. Darfeuille-Michaud, J. P. Girardeau, C. Rich, and B. Joly. 1994. Self-transmissible R plasmids encoding CS31A among human *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal stools. *Infect. Immun.* 62:2865-2873.
- Kaltenbach, L. S., B. A. Braaten, and D. A. Low. 1995. Specific binding of PapI to Lrp-pap DNA complexes. *J. Bacteriol.* 177:6449-6455.
- Lin, R., B. Ernsting, I. N. Hirshfield, R. G. Matthews, F. C. Neidhardt, R. L. Clark, and E. B. Newman. 1992. The *lrp* gene product regulates expression of *lysU* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 174:2779-2784.
- Low, D. A., B. A. Braaten, and M. van der Woude. 1996. Fimbriae, p. 146-157. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Marasco, R., M. Varcamonti, F. La Cara, E. Ricca, M. De Felice, and M. Sacco. 1994. In vivo footprinting analysis of Lrp binding to the *ilvIH* promoter region of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176:5197-5201.
- Martin, C. 1996. The *clp* (CS31A) operon is negatively controlled by Lrp, ClpB, and L-alanine at the transcriptional level. *Mol. Microbiol.* 21:281-292.
- Martin, C., C. Boeuf, and F. Bousquet. 1991. *Escherichia coli* CS31A fimbriae: molecular cloning, expression and homology with the K88 determinant. *Microb. Pathog.* 10:429-442.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Newman, E. B., and R. Lin. 1995. Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:747-775.
- Nicholson, B., and D. Low. 2000. DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 35:728-742.
- Nou, X., B. Braaten, L. Kaltenbach, and D. A. Low. 1995. Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by Pap I regulates *Pap* phase variation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14:5785-5797.
- Nou, X., B. Skinner, B. Braaten, L. Blyn, D. Hirsch, and D. Low. 1993. Regulation of pyelonephritis-associated pili phase-variation in *Escherichia coli*: binding of the PapI and the Lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation. *Mol. Microbiol.* 7:545-553.
- Platko, J. V., and J. M. Calvo. 1993. Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. *J. Bacteriol.* 175:1110-1117.
- Powell, B. S., M. P. Rivas, D. L. Court, Y. Nakamura, M. P. Rivas, and C. L. Turnbough. 1994. Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res.* 22:5765-5766.
- Ricca, E., D. A. Aker, and J. M. Calvo. 1989. A protein that binds to the regulatory region of the *Escherichia coli* *ilvIH* operon. *J. Bacteriol.* 171:1658-1664.
- van der Woude, M. W., L. S. Kaltenbach, and D. A. Low. 1995. Leucine-responsive regulatory protein plays dual roles as both an activator and a repressor of the *Escherichia coli* *pap* fimbrial operon. *Mol. Microbiol.* 17:303-312.
- van der Woude, M. W., and D. A. Low. 1994. Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 11:605-618.
- Weyand, N. J., and D. A. Low. 2000. Regulation of *pap* phase variation—Lrp is sufficient for the establishment of the phase off *pap* DNA methylation pattern and repression of *pap* transcription in vitro. *J. Biol. Chem.* 275:3192-3200.
- White-Ziegler, C. A., M. L. Angus Hill, B. A. Braaten, M. W. van der Woude, and D. A. Low. 1998. Thermoregulation of *Escherichia coli* *pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Mol. Microbiol.* 28:1121-1137.
- Xia, Y., K. Forsman, J. Jass, and B. E. Uhlin. 1998. Oligomeric interaction of the PapB transcriptional regulator with the upstream activating region of pili adhesin gene promoters in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 30:513-523.
- Zhi, J., E. Mathew, and M. Freundlich. 1999. Lrp binds to two regions in the *dadX* promoter region of *Escherichia coli* to repress and activate transcription directly. *Mol. Microbiol.* 32:29-40.

# ERRATUM

Data in bold were omitted:

TABLE 1. Transcription levels of *clp-lacZYA* in different media and different genetic backgrounds.

Strain	Genotype	Growth Medium <sup>a</sup>	Starting colony	Switch frequency		$\beta$ -galactosidase activity (MU)	% phase-ON cells
				ON to OFF	OFF to ON		
MC4100. $\lambda$ 6	<i>clpB</i> +	M9	U			112 $\pm$ 9	
	<i>lrp</i> +	M9- alanine	U			36 $\pm$ 3	
	<i>afaF</i> -	M9- leucine	U			53 $\pm$ 7	
MC4100. $\lambda$ 6(ptrf1)	<i>clpB</i> +, <i>lrp</i> +, <i>afaF</i> +	M9	Phase-ON	3.16x10 <sup>-2</sup>		87 $\pm$ 21	21.1
			Phase-OFF		1.47x10 <sup>-3</sup>	18 $\pm$ 5	3.68
		M9- alanine	U			<b>10 <math>\pm</math> 3</b>	
		M9- leucine	Phase-ON	3.24x10 <sup>-2</sup>		<b>47 <math>\pm</math> 22</b>	19.12
			Phase-OFF		1.81x10 <sup>-3</sup>	8 $\pm$ 3	4.53
DL844. $\lambda$ 6	<i>clpB</i> +	M9	U			493 $\pm$ 59	
	<i>lrp</i> -	M9- alanine	U			197 $\pm$ 39	
	<i>afaF</i> -	M9- leucine	U			250 $\pm$ 3	
DL844. $\lambda$ 6(ptrf1)	<i>clpB</i> +	M9	U			338 $\pm$ 57	
	<i>lrp</i> -	M9- alanine	U			163 $\pm$ 33	
	<i>afaF</i> +	M9- leucine	U			200 $\pm$ 66	
MC4100. $\lambda$ 15	<i>clpB</i> -	M9	U			775 $\pm$ 60	
	<i>lrp</i> +	M9- alanine	U			170 $\pm$ 20	
	<i>afaF</i> -	M9- leucine	U			238 $\pm$ 71	
MC4100. $\lambda$ 15(ptrf1)	<i>clpB</i> -, <i>lrp</i> +, <i>afaF</i> +	M9	Phase-ON	2.37x10 <sup>-2</sup>		336 $\pm$ 144	40.35
			Phase-OFF		1.15x10 <sup>-3</sup>	38 $\pm$ 11	2.96
		M9- alanine	U			11 $\pm$ 4	
		M9- leucine	Phase-ON	2.64x10 <sup>-2</sup>		152 $\pm$ 30	33.6
			Phase-OFF		1.16x10 <sup>-3</sup>	31 $\pm$ 4	2.91
DL844. $\lambda$ 15/1	<i>clpB</i> -	M9	U			276 $\pm$ 36	
	<i>lrp</i> -	M9- alanine	U			202 $\pm$ 28	
	<i>afaF</i> -	M9- leucine	U			295 $\pm$ 47	
DL844. $\lambda$ 15/1(ptrf1)	<i>clpB</i> -	M9	U			278 $\pm$ 81	
	<i>lrp</i> -	M9 alanine	U			221 $\pm$ 44	
	<i>afaF</i> +	M9 leucine	U			290 $\pm$ 26	